

UNIVERSITÉ DE LYON

FACULTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE — N° 310

**RECHERCHES SUR L'OXYDATION
DE L'ACIDE ASCORBIQUE
PAR L'OXYGÈNE MOLÉCULAIRE
(APPLICATION HYDROLOGIQUE)**

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
(SECTION DE PHARMACIE)

Présentée et soutenue publiquement devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie

Le 11 Juillet 1941.

PAR

M^{lle} Anne-Marie ROZIER

Assistante de Chimie biologique
Diplômée de Bactériologie

Née le 6 Août 1914, à LYON

LYON

IMPRIMERIE EMMANUEL VITTE
177, Avenue Félix-Faure

—
1941

**RECHERCHES SUR L'OXYDATION
DE
L'ACIDE ASCORBIQUE PAR L'OXYGÈNE MOLÉCULAIRE
(APPLICATION HYDROLOGIQUE)**

UNIVERSITÉ DE LYON

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE — N° 310

**RECHERCHES SUR L'OXYDATION
DE L'ACIDE ASCORBIQUE
PAR L'OXYGÈNE MOLÉCULAIRE
(APPLICATION HYDROLOGIQUE)**

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

(SECTION DE PHARMACIE)

Présentée et soutenue publiquement devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie

Le 11 Juillet 1941.

PAR

M^{lle} Anne-Marie ROZIER

Assistante de Chimie biologique

Diplômée de Bactériologie

Née le 6 Août 1914, à LYON

LYON

IMPRIMERIE EMMANUEL VITTE

177, Avenue Félix-Faure

—
1941

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyen honoraire.....	M. L. HUGOUNENQ.
Doyen	M. J. LÉPINE.
Assesseur	M. A. MOREL.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. LANNOIS, HUGOUNENQ, PIC, CONDAMIN, PAVIOT,
NICOLAS, VILLARD, NOVÉ-JOSSERAND, TIXIER, COLLET, GAYET, CLUZET.

PROFESSEURS

Cliniques médicales	MM. FROMENT. SAVY. PATEL. BÉRAUD. VORON. BONNET. FAVRE. LÉPINE (J.). MOURIQUAND. COTTE. REBATTU. CIBERT. TAVERNIER. COURMONT. J. CHALIER. PONTHUS. FLORENCE. MOREL. MANCEAU. GUIART. LATARJET. POLICARD. HERMANN. CORDIER. CADE. J.-F. MARTIN. SANTY. ARLOING (F.). MAZEL. ROCHAIX. LEULIER. PIÉRY.
Cliniques chirurgicales	
Clinique obstétricale et Accouchements	
Clinique ophtalmologique	
Clinique dermatologique et syphilitigraphique	
Clinique neurologique et psychiatrique	
Clinique médicale infantile	
Clinique gynécologique	
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	
Clinique urologique	
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	
Clinique et prophylaxie de la tuberculose	
Clinique des maladies infectieuses	
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie	
Chimie biologique et médicale	
Chimie organique et Toxicologie	
Matière médicale et Botanique	
Parasitologie et Histoire naturelle médicale	
Anatomie	
Histologie	
Physiologie	
Pathologie interne	
Pathologie générale et thérapeutique	
Anatomie pathologique	
Chirurgie opératoire	
Médecine expérimentale et comparée et Bactériologie	
Médecine légale	
Hygiène	
Pharmacie et Pharmacologie	
Hydrologie thérapeutique et Climatologie	

PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

Chargé d'un cours d'Anatomie médico-chirurgicale.....	MM. THÉVENOT (Léon)
Chargé d'un cours d'Embryologie	NOEL.

AGRÉGÉS

MM. GABRIELLE CHAMBON REVOL ENSELME SEDALLIAN CREYSEL DE ROUEMONT	MM. P. RAVAUULT PIGEAUD CROIZAT DELORE JOSSEMAND MORIN BERTRAND	MM. CLAVEL LEVRAIT BANSSILLON MALLET-GUY ROMAN PEYCELON JOURDAN	MM. FROMENT (R.) MARTIN (P.-E.) MOUNIER-KUHN BROUSSY PIFFAULT
--	--	--	--

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM. MOREL, *président*;

PIÉRY, GATÉ, ENSELME, *assesseurs*.

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

A MES PARENTS

Qu'ils veuillent bien trouver dans ce travail le témoignage de mon affection et de ma grande reconnaissance.

A MA GRAND'MÈRE

A LA MÉMOIRE DE MES GRANDS-PARENTS

AUX MIENS

ET A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE
MONSIEUR LE PROFESSEUR MOREL,
Professeur de Chimie organique.

C'est à ses enseignements que nous devons en partie notre formation. Pour avoir bien voulu nous aider dans notre travail et accepter de le juger, nous lui exprimons notre respectueuse gratitude.

A M. LE PROFESSEUR CORDIER,

*Professeur de Pathologie Interne,
Médecin des Hôpitaux.*

Nous le remercions de l'intérêt bienveillant qu'il a toujours porté à notre travail. En nous accueillant dans son Laboratoire, il nous a constamment donné les preuves d'une grande bonté à notre égard.

Nous l'assurons de notre reconnaissance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR PIÉRY

Professeur d'Hydrologie et de Climatologie médicale.

Nous le remercions infiniment de l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de s'intéresser à notre Thèse.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR GATÉ,
Professeur d'Hydrologie et de Clinétologie médicale,
Médecin des Hôpitaux.

Nous lui sommes reconnaissant
d'avoir bien voulu faire partie de
notre Jury de Thèse.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ ENSELME,
Professeur Agrégé
de Chimie biologique et médicale.

Pendant de longs mois et dans une
atmosphère d'intimité et de sympathie,
nous avons eu l'honneur de travailler
sous sa direction. Il s'est toujours
montré pour nous le Maître patient et
indulgent, s'efforçant sans cesse de
nous inculquer l'amour de la vérité et
de la précision. Au cours de ce travail
qu'il nous a inspiré et qui fut quel-
quefois aride et monotone, il a sou-
vent relevé notre énergie et notre
persévérance. C'est à lui que va notre
gratitude et nous nous souviendrons
toujours de la bonté qu'il nous a
témoignée.

A NOS MAITRES DE LA FACULTE
DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

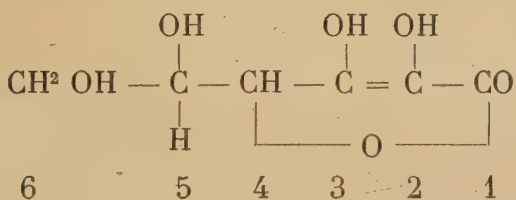
**RECHERCHES SUR L'OXYDATION
DE
L'ACIDE ASCORBIQUE PAR L'OXYGÈNE MOLÉCULAIRE
(APPLICATION HYDROLOGIQUE)**

CHAPITRE PREMIER

**L'acide ascorbique,
agent d'oxydo-réduction**

A. GÉNÉRALITÉS

L'acide *l*-ascorbique ou Vitamine C possède la formule suivante :



Nous n'avons pas l'intention ici de reprendre l'étude complète de l'acide ascorbique. Nous nous contenterons de signaler les points de sa chimie qui intéressent son attitude oxydo-réductrice.

I. Extraction d'un acide ascorbique. Méthodes mises en œuvre pour éviter les oxydations.

L'extraction a été réalisée la première fois par SZENT GYÖRGYI suivant une technique qui vise d'une part à son isolement, d'autre part à éviter son oxydation. Cette technique est la suivante :

Des oranges mûres sont coupées en deux et pressées à l'aide d'un presse-citron. Puis, le jus est filtré sur une mousseline, et, à chaque litre de jus filtré, on ajoute 0,1 cm³ de cyanure de sodium à 10 %. Le liquide est amené à pH 6,2, et additionné d'une solution saturée d'acétate de baryum suffisante pour réaliser une concentration à 5 %. Il est ensuite placé à la glacière dans des bouteilles pleines et fermées, et il est filtré le lendemain sur pulpe de papier. Le filtrat est concentré « in vacuo », à 25° au cinquième de son volume ; il est refroidi dans la glace et filtré encore une fois après formation d'un nouveau précipité. Après une nouvelle addition de cyanure de sodium (0,1 cm³ à 10 % par litre), et ensuite une addition d'acétate de plomb en solution saturée, suffisante pour réaliser une concentration de 10 %, le liquide est refroidi dans la glace. En agitant soigneusement, on ajoute de l'ammoniaque, en quantité juste suffisante pour obtenir la coloration bleue du bromothymol. Puis, le liquide est rapidement filtré ; le précipité est lavé avec de l'eau et mis en suspension dans un volume d'eau aussi faible que possible, puis décomposé par l'acide sulfurique, en évitant l'excès d'acide.

Après avoir éliminé le sulfate de plomb par filtration,

on amène le pH à 6, et, si cela est nécessaire, on réduit par distillation dans le vide le volume du liquide à un vingtième de son volume original. On ajoute à ce liquide trois fois son volume d'alcool à 96°, et, après séparation du précipité qui se forme éventuellement, on ajoute au mélange un excès de solution chaude d'acétate de plomb. Le liquide est refroidi, pendant une heure, dans la glace et filtré, et le précipité est séché dans le vide, sur de l'acide sulfurique. Le précipité sec est pulvérisé, et mis en suspension dans l'acétone fraîchement distillée et exempte d'eau, en prenant 100 cm³ d'acétone par litre de jus. On fait passer un courant de H² S jusqu'à ce que le précipité soit décomposé entièrement, puis, l'acétone est évaporée à basse température et portée à un tout petit volume. On ajoute le même volume d'éther, et un excès de pétrole léger qui précipite un produit huileux en retenant la plus grande partie de l'acide acétique. Le précipité huileux est porté dans une fiole d'Erlenmeyer (le flacon à distiller ayant été lavé avec quelques cm³ d'alcool méthylique). Le sirop est séché « in vacuo » sur de l'acide sulfurique. Le résidu solide est extrait à plusieurs reprises avec de petites quantités (5 cm³) d'acétone exempte d'eau; Cette acétone est ensuite évaporée « in vacuo » à basse température. Le résidu est dissous dans 2-3 cm³ d'alcool méthylique; puis on ajoute 15 cm³ d'éther exempt d'eau. S'il se forme un précipité, on le sépare et on l'extrait par l'acétone; l'acétone est traitée ensuite comme nous l'avons dit plus haut. A la solution claire alcool-éther, on ajoute un excès de pétrole léger (10 fois le volume du liquide) et le mélange est porté à la glacière.

Le lendemain, on trouve un précipité cristallin au fond du tube, avec un produit huileux. Les cristaux sont lavés avec de l'acétone refroidie. Pour éliminer les traces d'acétone, on lave à nouveau avec de l'éther.

Addition de cyanure, soin de se tenir constamment en pH acide et aux basses températures, emploi d'hydrogène sulfuré, utilisation du vide, sont autant de manœuvres qui permettent d'éviter l'oxydation du produit au cours de la préparation.

De l'acide ascorbique préparé par SZENT GYÖRGYI en utilisant cette méthode a été utilisé par un grand nombre d'auteurs : LAKI, en 1933 ; BORSOOK et KEIGHLEY, en 1933 ; WURMSER et LOUREIRO, en 1933 et 1934 ; FRUTON, en 1934 ; BALL, en 1937.

II. Les acides ascorbiques de synthèse. Méthodes mises en œuvre pour éviter les oxydations.

SYNTHÈSE DE L'ACIDE *l*-ASCORBIQUE.

Elle a été réalisée, depuis 1933, par plusieurs procédés, dont les plus récents donnent d'assez bons rendements pour que le prix de vente de la vitamine C synthétique ne dépasse plus sensiblement 5 francs le gramme.

Premier procédé (1933) découvert et décrit presque simultanément par HAWORTH et HIRST (G. chem. Soc. London) et par REICHSTEIN (Helv. chim. Acta). En hydrolysant le composé cyclisé intermédiaire résul-

tant de l'action de l'acide cyanhydrique sur la *l*-xylosone, on obtient l'acide *l*-ascorbique. Mais la *l*-xylosone est difficile et coûteuse à obtenir par une longue série de transformations : *d*-galactose, $\rightarrow$ diacétone-galactose, $\rightarrow$ acide diacétone-galacturonique, $\rightarrow$ acide *d*-galacturonique, $\rightarrow$ acide *l*-galactonique, $\rightarrow$ *l*-galactonamide, $\rightarrow$ *l*-lyxose, $\rightarrow$ *l*-xylose, $\rightarrow$ *l*-xylosazone, $\rightarrow$ *l*-xylosone.

La xylosozone brute est dissoute dans de l'eau distillée, bouillie sous azote, et refroidie par passage d'un courant d'azote à 0°. On ajoute, toujours sous azote, de l'acide cyanhydrique et du cyanure de potassium et, toujours en atmosphère d'azote, on laisse pendant six jours à 20°. On réfrigère alors et l'on ajoute de l'acide chlorhydrique concentré. On fait passer un courant d'anhydride carbonique qui chasse l'acide cyanhydrique. La solution obtenue est réduite dans le vide, en présence d'alcool butylique. On a un résidu cristallisé; on le dissout dans l'alcool absolu, et on le filtre. On lave à l'éther. La solution éther-alcool est distillée à 50°; l'éther s'élimine; on dessèche ensuite dans le vide; on chauffe le résidu au vide à 60°, pour éliminer toutes les impuretés volatiles, et surtout l'acide chlorhydrique. Il reste un sirop brun, qui est dissous dans de l'alcool absolu; on ajoute une solution froide d'acétate de plomb saturée dans de l'alcool à 95°. On a un précipité que l'on sépare par centrifugation et qu'on lave à l'alcool. Le sel de plomb est lavé avec de l'eau bouillante, chauffée en présence de CO² et refroidie par un courant de CO². On traite par l'hydrogène sulfuré, on filtre. Le filtrat est

desséché alors dans le vide; on obtient une substance sirupeuse, à laquelle on ajoute de l'alcool méthylique. On ensemente avec un cristal d'acide ascorbique; on laisse reposer douze heures. On obtient un gâteau huileux; on le traite par l'acétone, jusqu'à obtention de cristaux blancs. Le produit obtenu a un point de fusion entre 187 et 189°.

Deuxième procédé (1933-1934) décrit par REICHS TEIN (Helv. chim. Acta. 17, 311) et breveté par lui (Schw. Pat., n^{os} 171.716 et 174.208 et Brev. franç. au nom d'HOFFMANN-LA ROCHE et C^o, n^{os} 779.883 et 780.055).

Il applique à la préparation de l'acide l-ascorbique à partir de l'acide 2-céto-*l*-gulonique et à l'obtention de ce dernier à partir du *l*-sorbose les procédés décrits pour celles des isomères stéréochimiques : respectivement, acide 2-céto *l*-gluconique et acide d-arabo-ascorbique, par OHLE (Ber. 67, 555) et par MAURER et SCHIEDT (Ber. 66 et 67). Pour cela, on part du *l*-sorbose, obtenu lui-même par oxydation fermentaire du d-sorbitol, suivant la technique de Gabriel BERTRAND. On oxyde sa combinaison diacétonique par le permanganate en milieu alcalin, puis on réalise par action d'une base ou d'un acide l'énolisation de l'acide 2-céto-*l*-gulonique et enfin la lactonisation du produit formé.

De la lecture des mémoires ou des brevets, il ne résulte pas qu'au cours de la synthèse par le deuxième procédé on ait été obligé d'employer d'autres précautions que le remplacement de l'air par l'azote ou un

autre gaz inerte quand on traite l'éther méthylique de l'acide 2-céto-*l*-gulonique par le sodium et l'alcool méthylique et que l'emploi du vide pour l'évaporation de l'alcool méthylique après acidification du milieu par H-Cl. Il n'y est pas indiqué qu'il faille prendre des précautions spéciales pour la séparation et l'essorage des cristaux, ni pour leur recristallisation dans l'eau ou dans les alcools.

Plus récemment REICHSTEIN est arrivé à obtenir l'acide 2-céto-*l*-gulonique à partir du glucose qu'il transforme facilement en *l*-sorbose.

Troisième procédé (1934) décrit par HAWORTH et HIRST (Nature : London, 134, p. 724) et breveté par eux (Brit. Pat., n° 443, 901). Il est encore plus simple. Il donne l'acide 2-céto-*l*-gulonique par oxydation directe du *l*-sorbose, à l'aide de l'acide nitrique, dans des conditions soigneusement contrôlées, disent ces chimistes dans leur mémoire des *Ergebn. d. Vitamin. und. Hormon. Forsch.* to 2, et il continue la transformation jusqu'à l'acide *l*-ascorbique comme dans le deuxième procédé.

Par des procédés analogues, différents corps, présentant avec l'acide *l*-ascorbique des analogies, du point de vue de la présence d'un groupement biénolique voisin d'un anneau lactonique, ont été obtenus par synthèse.

III. Les méthodes de purification :

SZENT GYÖRGYI conseille de faire dissoudre la substance dans la plus petite quantité possible d'alcool méthylique ; puis on ajoute progressivement de l'éther et de l'éther de pétrole.

Le même auteur conseille en solution aqueuse de faire cristalliser dans le vide sulfurique.

Nous avons vu, dans les méthodes d'extraction ou de synthèse, une purification par l'acétone.

IV. Les critères de pureté.

Les critères de pureté le plus souvent utilisés sont les suivants :

1^o L'étude de la forme des cristaux. Après cristallisation dans le mélange alcool méthylique — éther — éther de pétrole, on a des petits plateaux combinés entre eux en figures compliquées.

2^o L'analyse élémentaire donne pour la formule $C^6 H^8 O^6$, le pourcentage suivant : en carbone : 40,9 % ; en hydrogène : 4,5 % ; en oxygène : 54,6 %.

3^o Le point de fusion, d'après LAKI, est de 192°. Les produits préparés par SZENT GYÖRGYI ont le plus souvent des points de fusion entre 175° et 189°. Les produits préparés par REICHSTEIN fondent à 190° en se décomposant, ou même un peu plus haut en tube privé d'air.

4° La titration par l'iode doit entraîner deux hydrogènes.

5° L'équivalent de neutralisation sera recherché.

6° Le pouvoir rotatoire est dans l'eau à la concentration de 14 % de $[\alpha]^D = + 24^\circ$, dans l'alcool, de $[\alpha]^D = + 48^\circ$.

7° SZENT GYÖRGYI utilise en outre quelques réactions chimiques telles que la réduction de la liqueur de Fehling, du nitrate d'argent neutre, du permanganate de potasse, la réaction de Molisch.

8° GIROUD et LEBLOND utilisent la réduction du nitrate d'argent décrite par SZENT GYÖRGYI pour la recherche de la vitamine C dans les organes et dans les aliments.

9° MOREL et MARTHOUD ont signalé au 6^e congrès de la Société de Chimie biologique en 1936 l'intensité et la rapidité avec lesquelles l'acide *l*-ascorbique réduit, en milieu alcalin, l'o-dinitrobenzène, avec formation du sel alcalin d'o-nitrophénylhydroxylamine, fortement coloré en violet.

B. ÉTUDE DE L'ACIDE ASCORBIQUE PAR LES TECHNIQUES ÉLECTROMÉTRIQUES

On sait que l'on considère actuellement une oxydation comme une perte d'électrons, et une réduction comme un gain d'électrons.

Dans un milieu, un équilibre s'établit entre la forme oxydée et la forme réduite d'un corps, constituant alors un système Redox, ou un mélange Redox, qui s'exprime :

Corps réduit — n électrons = corps oxydé.

Si on fait plonger une électrode inattaquable, faite de platine ou d'or brillant, dans un mélange Redox, et qu'on l'assemble par un pont de jonction formé d'un liquide conducteur avec une électrode au calomel, on a une pile qui présente entre ses deux bornes une différence de potentiel. Ce potentiel est corrigé par un calcul, de telle sorte qu'il soit rapporté non à l'électrode au calomel utilisée, mais à une électrode d'hydrogène. Il exprime donc les résultats qu'on aurait obtenus en remplaçant l'électrode au calomel par une électrode d'hydrogène (1). Ce potentiel est dit potentiel d'oxydoréduction.

Pour mesurer la différence de potentiel qui se produit aux bornes des deux électrodes (électrode inerte

(1) L'électrode d'hydrogène est ainsi préparée : une lame de platine recouverte de mousse de platine, imprégnée d'hydrogène, plonge dans une solution où se trouvent des ions H^+ (Acide tel que $SO^4 H^2$). La lame de platine se comporte comme une lame d'hydrogène.

et électrode au calomel), il faut faire débiter un courant ; or, en débitant ce courant, la force électromotrice diminue, du fait de la polarisation et de la variation dans la concentration des électrolytes. Pour éviter cette diminution, on emploie la méthode de POGGENDORFF. On empêche la pile de fournir un courant en lui opposant une force électromotrice égale à la sienne. La force qui lui est opposée provient d'un élément d'accumulateur, aux bornes duquel il y a une différence de potentiel, exactement déterminée.

L'opposition exacte s'obtient en intercalant une résistance variable, dont la valeur, expérimentalement définie, permettra, connaissant la force électromotrice de l'accumulateur, de calculer la force électromotrice de la pile. L'équilibre est donné par l'absence de courant, qui est exprimée par un appareil de zéro : électromètre capillaire de LIPPMANN, ou galvanomètre de DÉPREZ-D'ARSONVAL. Le potentiel trouvé peut se décomposer ainsi :

E (potentiel trouvé) = E_H (potentiel au contact platine/solution Redox) + E_C (potentiel calomel/mercure).

Le potentiel E_H qui nous intéresse a donc pour valeur :

$$E_H = E - E_C.$$

E_C a pour la pile au calomel des valeurs variables selon les températures, valeurs qui sont les suivantes, exprimées en volts :

A 18° : 0,338 ; à 20° : 0,3379 ; à 25° : 0,3376 ; à 30° : 0,3371 ; à 35° : 0,3365 ; à 38° : 0,3361 ; à 40° : 0,3358.

Le potentiel d'oxydoréduction varie selon les quantités réciproques des formes oxydées et des formes réduites en présence.

Ce potentiel, lorsque les deux formes, oxydée et réduite, sont en quantités équivalentes, porte le nom de potentiel normal : E_o . CLARK a proposé de donner le symbole rH au logarithme de l'inverse de la pression d'hydrogène qui s'exerce sur un système Redox.

On passe de la différence de potentiel E_H d'un système à son rH par la formule :

$$rH = \frac{E_H + c \text{ pH}}{c/2}$$

La constante c a les valeurs suivantes :

A 18° : 0,05773 ; à 20° : 0,058128 ; à 22° : 0,058525 ;
à 25° : 0,05912 ; à 30° : 0,06011.

Le potentiel d'oxydo-réduction est d'autant plus élevé que la forme oxydée prédomine plus.

Le rH est d'autant plus élevé que la forme oxydée prédomine plus.

En face d'un milieu présumé oxydo-réducteur, comme celui qui est formé par la solution d'acide ascorbique, il convient d'abord de montrer la réversibilité du milieu. Deux méthodes ont été employées :

a) On peut partir de la forme réduite et en l'absence d'oxygène, lui ajouter un oxydant. On fait une courbe en portant en abscisse les quantités d'oxydant ajoutées et en ordonnée les valeurs des différences de potentiel correspondantes. Dans le cas d'un milieu Redox réversible, la forme de la courbe

est celle d'un S, ce qui signifie qu'autour du potentiel normal, la progression est minime. (C'est une zone tamponnée.)

b) On peut partir de la forme oxydée, et en absence d'oxygène lui ajouter des réducteurs, en portant en abscisse la quantité de réducteurs ajoutée et en ordonnée les valeurs de potentiel correspondantes ; on obtient une courbe en S, symétrique de la précédente.

Un milieu étant dès lors démontré réversible, il convient de le caractériser au point de vue oxydo-réducteur. Pour cela :

a) On détermine son potentiel d'oxydo-réduction à un pH donné, pour une température donnée, et on l'exprime soit par sa valeur en millivolts, soit par sa traduction en valeur de rH.

b) Par la courbe de titration qui sert à démontrer sa réversibilité on obtient la valeur de son potentiel normal : E_0 . C'est la valeur de la différence de potentiel lorsque la concentration de la forme oxydante est égale à celle de la forme réduite.

c) Connaissant ces deux valeurs : E_H et E_0 , on peut calculer le pourcentage de la forme oxydée et de la forme réduite mises en présence dans la solution étudiée. Pour cela, on applique la formule :

$$E_H = E_0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{\text{Conc. Red}}{\text{Conc. Ox}} \quad (1)$$

dans laquelle :

(1) Le symbole $\ln$ signifie logarithme naturel.

$R = 8,315771$ joules. T : température absolue.
 n : éléments bivalents = 2, éléments monovalents = 1.
 $F = 96.494$ coulombs.

A 19°, on a :

$$\log \frac{c_{\text{Red}}}{c_{\text{Ox}}} = \frac{E_o - E}{0,0579}$$

Par ces techniques, les résultats obtenus ont été les suivants :

1° En octobre 1928, SZENT GYÖRGYI, alors fellow de la Fondation Rockefeller au Laboratoire de Biochimie de Cambridge (Professeur HOPKINS), ayant préparé de l'acide ascorbique, montrait que à pH 7 et avec électrode d'or, la solution d'acide ascorbique a un potentiel réducteur bien défini. Elle abaisse le E_H de la solution-tampon de + 240 mv à + 90 mv (soit 150 mv), ce qui correspond à un rH de 17,14.

2° En 1932, GEORGESCU, travaillant à Paris dans le Laboratoire de WURMSER, recherche le potentiel oxydoréducteur de l'acide ascorbique. Il utilise la technique indiquée par WURMSER et GELOSO, qui permet de faire des mesures en vase clos, après élimination de l'oxygène gazeux.

L'élément est constitué par un ballon contenant la solution d'acide ascorbique (100 milligr. d'acide ascorbique en solution dans un tampon de phosphates à pH 7). Une électrode inerte plonge dans ce liquide. On ajoute à ce liquide peu à peu une solution oxydante, qui est ici une solution de ferricyanure de potassium à 10 %.

Toutes ces opérations se font dans le vide. Une électrode de référence, à potentiel constant, est constituée par une électrode au calomel, les deux éléments précédents sont reliés par un simple tube capillaire. Le passage du courant de l'un à l'autre est assuré par l'électrolyte fixé sur la surface interne du tube capillaire; pour que la résistance ne soit pas trop forte, le tube est en cristal Martin, facilement attaquable. Les mesures des forces électromotrices, qui s'établissent entre les deux fils de platine de ces électrodes sont effectuées par la méthode d'opposition, l'appareil de zéro étant constitué par un électromètre à lampe triode de COURTINES et GELOSO.

L'acide ascorbique est préparé par l'auteur, selon la méthode de SZENT GYÖRGYI. Aucun critère de pureté n'est donné.

Les résultats sont les suivants :

En ajoutant du ferricyanure, l'équilibre s'établit peu à peu, et si l'on attend 24 heures pour mesurer la différence de potentiel, il paraît être atteint. En portant en abscisse les quantités de ferricyanure introduites, et en ordonnée les différences de potentiel en millivolts, on obtient une courbe en palier. L'auteur croit pouvoir, de cette courbe, déduire un potentiel normal qui à pH 7 et à 20°, serait de 30 mv, ce qui correspond à un rH de 15. L'auteur ajoute que cette forme en palier est la caractéristique fondamentale d'une courbe de titrage d'un système en équilibre d'oxydoréduction.

Ces résultats ont été l'objet de nombreuses et très sévères critiques. En 1933, GREEN lui reproche de n'avoir donné aucun critère de pureté de ses produits et d'avoir employé un appareil pour les mesures potentiométriques qui n'est peut-être pas exempt de toute critique.

En 1933 encore, BORSOOK et KEIGHLEY, montrent que la courbe de GEORGESCU n'est pas une courbe en S typique des systèmes Redox en équilibre, mais une courbe en plateau. En effet, à pH 6,9, la différence de potentiel observée entre une oxydation de 5 % et une oxydation de 80 %, est seulement de 22 mv, alors que la théorie exige 55 mv. De même, à pH 7, la différence de potentiel est nulle entre une oxydation de 12,5 % et une oxydation de 75 %, alors que la théorie exigerait une différence de 39 mv. Enfin, WURMSER lui-même indique que la courbe de GEORGESCU n'est pas un S, mais un plateau, ce qui est dû à l'instabilité de la forme oxydée. La faible électro-activité de l'acide ascorbique attire ce plateau vers le potentiel normal de l'agent de titrage. Par suite de cette instabilité, on ne peut pas parler, dit WURMSER, de potentiel normal, mais de « potentiel caractéristique ».

3^o LAKI, travaillant à la Fondation MACY en 1933, sur un acide ascorbique, préparé par SZENT GYÖRGYI, purifié par recristallisation, et dont le point de fusion serait le point de fusion théorique de 192^o, réalise l'expérience suivante :

Vingt milligrammes d'acide ascorbique sont dilués

dans 1 cm³ d'eau, neutralisée par la soude et étendue avec 7 cm³ d'une solution de phosphate m/15, à pH 7. La solution est mise dans un récipient convenable, le potentiel est mesuré avec une électrode d'or, en faisant passer de l'azote; l'autre électrode est au calomel. Le potentiel s'établit en 15 minutes et peut être reproduit à volonté; l'oxydant, qui est du ferricyanure de potassium, est ajouté par fractions de 0 cc,15 à 0 cc,35 d'une solution préparée de telle sorte que 2 cm³ correspondent à la quantité utilisée d'acide ascorbique.

Il ressort de l'examen de la courbe que le potentiel varie de la même façon que si l'acide ascorbique présent avait été diminué d'une quantité correspondante à la portion oxydée. En somme, tout se passe comme si le potentiel n'était proportionnel qu'à la forme réduite; la forme oxydée étant inactive sur l'électrode.

4^o KARRER, SCHWARZENBACH et SCOFF, travaillant à l'Institut de Chimie de l'Université de Zurich, en 1933, reprennent cette question :

Quelque essais de titration potentiométrique leur montrent qu'il ne peut s'agir d'un système d'oxydo-réduction réversible, au sens exact du mot. Ils utilisent une électrode de platine qu'ils plongent dans une solution tamponnée d'acide ascorbique (0,0035 mol.), en atmosphère d'azote. Ils ajoutent du ferricyanure de potassium (0,04 N).

En solution acide, et jusqu'à, sensiblement pH 9, ils observent que l'adjonction de l'oxydant produit

d'abord une augmentation, puis une diminution lente du chiffre primitif qui, après 20 à 30 minutes, est de nouveau atteint. L'oxydant est donc utilisé lentement par la substance ; la concentration du produit d'oxydation formé ne semble pas avoir d'influence sur le potentiel. Seulement, vers la fin de la titration, la courbe de potentiel monte lentement, pour se terminer par un crochet bien dessiné ; celui-ci apparaît cependant toujours plus précocement que ne le demanderait la quantité ajoutée. On l'a observé à pH 3, à pH 7 et à pH 9, pour une adjonction de 1,75 ; 1,40 ; 1,62 d'oxygène équivalent à une molécule d'acide ascorbique. La situation du point terminal dépend de la durée de la titration. Si on attend longtemps, ce crochet du potentiel redescend. Avec du bichromate de potassium (0,04 N) en solution acide (pH 2), les points terminaux correspondent à des équivalents d'oxygène de 1,98 et 1,94. Avec du chlorure de titane, il n'y a pas de crochet à la courbe des valeurs du potentiel.

En solution alcaline, à pH supérieur à 9,5, le ferri-cyanure de potassium est très rapidement utilisé par l'acide ascorbique. Déjà une demi-minute après l'adjonction de l'oxydant, le potentiel a retrouvé sa valeur primitive ; il continue à baisser rapidement, pour aller après deux à trois minutes jusqu'à un potentiel négatif de 600 mv, et revenir au potentiel primitif, lentement, en 20 minutes. Ce comportement remarquable se retrouve à chaque nouvelle adjonction d'oxydant et pourrait peut-être s'expliquer par l'apparition d'un produit intermédiaire de très grand pouvoir réducteur.

La terminaison de la titration s'annonce encore ici par un crochet du potentiel, mais qui lui aussi ne se manifeste pas au point stéochiométrique exact ; il se place trop tôt ou trop tard, selon la rapidité de la titration et la quantité d'oxydant ajoutée. Des solutions simplement tamponnées d'acide ascorbique (0,0035 mol.) donnent un potentiel facile à reproduire, la mise en équilibre en solution acide réclamant à peu près trois heures, et en solution alcaline beaucoup plus de temps. En présence d'une électrode au calomel saturée, la solution étant à 40°, les auteurs ont obtenu les potentiels suivants exprimés en volts :

pH	1,2	3,1	5,1	7	9,2
1 ^{re} mesure :	+ 0,105	+ 0,02	— 0,141	— 0,238	— 0,331
2 ^e mesure :	+ 0,104	+ 0,014	— 0,142	— 0,226	— 0,298

5° En 1933, GREEN, travaillant au Laboratoire de Biochimie de l'Université de Cambridge, reprend ces mêmes recherches.

L'élément est formé par un récipient d'une capacité de 50 cm³, dans lequel pénètrent une burette et 3 électrodes, une électrode de platine platiné, une électrode de platine blanc et une électrode d'or. Pour assurer l'absence d'oxygène, ce flacon est balayé par un courant d'hydrogène et d'azote, débarrassés de l'oxygène par passage sur de la tournure de cuivre au palladium, portés vers 500-600°. L'élément de référence est une électrode au calomel. L'ensemble peut être plongé dans un thermostat à 30°. Un potentiomètre, un galvanomètre sont

utilisés pour mesurer le potentiel ; les lectures sont sensibles à $\pm 0,2$ mv.

L'acide ascorbique est préparé par HARRIS. Sa pureté est affirmée par la titration par l'iode, l'équivalent de neutralisation et l'analyse élémentaire portant sur le carbone et l'hydrogène.

Les résultats sont les suivants : Après que l'équilibre est réalisé, l'électrode d'or et de platine donnent les mêmes valeurs. Après addition d'un oxydant, on a un saut de plusieurs centaines de millivolts, vers un potentiel plus positif. Mais en une heure environ, le potentiel retourne à sa valeur d'origine ; les mensurations sont retenues lorsque le potentiel est constant depuis 30 minutes. Une solution d'acide ascorbique 0,001 N. est titrée avec une solution de ferricyanure de potassium 0,002 N., à pH 7,08. La solution, complètement réduite, donne une valeur $E_H = 54$ mv.

L'addition d'agent oxydant ne donne pas de modification de potentiel. Lorsque l'on atteint une oxydation de l'acide de 95 %, le potentiel monte à 20 mv. De nouvelles additions d'oxydant obligent le potentiel à gagner le côté positif.

On obtient des résultats semblables à des pH de 3, 4, 5, 6, 8. C'est encore des résultats comparables qu'on obtiendra en modifiant l'oxydant et en prenant du phénol-indophénol, de la quinone, de la 2 — 6 dichlorophénolindophénol, de l'orthocrésolindophénol.

Il apparaît donc que le potentiel dépend uniquement du réducteur, l'oxydant ne paraît pas en équilibre avec ce dernier.

Les auteurs précisent en outre un certain nombre de points. Il paraît bien que le potentiel ne dépend pas de la concentration absolue du réducteur, sinon on aurait en le détruisant par addition d'oxydant, une chute progressive de potentiel. Deux solutions d'acide ascorbique, ajustées au même pH, l'une 0,001 M., l'autre 0,01 M., donnent une même valeur de $E_H = + 163$ mv.

Pour un pH donné, le potentiel atteint, dans diverses expériences, est le même à ± 5 mv près.

Les valeurs de E_H varient avec le pH suivant la formule : $E_H = + 0,375 - 0,06$ pH.

6° BORSOOK et KEIGHLEY, travaillant au Laboratoire des Sciences biologiques de l'Institut de Technologie de Pasadena en Californie en 1933, reprennent cette étude. Ils partent de cette hypothèse que l'acide ascorbique, à des pH proches de la neutralité, se décompose rapidement. Ils vont donc se placer à des pH situés entre 2 et 5,75.

Ils travaillent sur de l'acide ascorbique préparé par SZENT GYÖRGYI, et dont la pureté est attestée par la titration à l'iode. Les mesures sont faites à 35°5.

L'appareil utilisé a été décrit en 1931 par BORSOOK et HERMANN. C'est un appareil qui dérive de la méthode de THUNBERG. C'est essentiellement des mesurations pratiquées dans le vide. La modification apportée par BORSOOK et HERMANN consiste dans le fait que le vase qui contient la solution et l'électrode se termine à sa partie inférieure par un tube capillaire qui sert de pont. Le tube plonge en effet dans un vase contenant une

solution saturée de chlorure de potassium. Cette solution est par ailleurs en communication avec l'électrode de référence. Ce tube capillaire est rempli d'agar-agar, saturé de chlorure de potassium. Avec ce dispositif, il est possible de faire plusieurs déterminations simultanées en utilisant une seule électrode de référence, qui est ici une électrode au calomel. Les électrodes inertes sont en or ou en platine platiné. L'électrode est remplie par le liquide étudié et par les tampons dans une chambre refroidie à 2°, où sont maintenues les solutions étudiées. On porte ensuite l'appareil une minute à la température du laboratoire, puis dans un bain-marie à 37°. On fait le vide.

Les pH sont recherchés au moyen d'une électrode de MOLONEY.

BORSOOK et KEIGHKEY appliquent l'équation :

$$E_{\text{obs}} = \tilde{E} + \frac{RT}{F} \text{pH} + \frac{RT}{2F} \ln \frac{(\text{Red})}{(\text{ox})} + \frac{RT}{2F} \ln \frac{K_r}{K_o} + \frac{RT}{2F} \ln \frac{K_o + [H^+]}{K_r + [H^+]}$$

E_{obs} = Potentiel observé en volts.

$\tilde{E} = -0,553$.

$n = 2$ (comme l'indique la titration par l'iode).

K = constante de dissociation de la forme réduite
 $\text{p}K_r = 4,17$.

K_o = constante de dissociation de la forme oxydée
 $\text{p}K_o = 9$.

Les résultats sont les suivants : A tous les pH, entre 2 et 5,75, le potentiel trouvé et le potentiel calculé ne sont que très faiblement différents, cette différence pouvant s'expliquer par des erreurs. L'équation précédente s'applique donc bien et le potentiel est proportionnel au rapport de la concentration de la forme réduite et de la forme oxydée. Cette équation étant établie par un raisonnement sur les systèmes réversibles, il est probable que les solutions d'acide ascorbique constituent un tel système.

7° WURMSER et LOUREIRO, en 1933, publièrent dans les comptes rendus de la Société de Biologie les résultats d'un travail réalisé avec de l'acide ascorbique envoyé par SZENT GYÖRGYI. L'oxydation est obtenue au moyen de l'iode, à 20°. Les auteurs obtiennent une courbe en S lorsqu'ils se maintiennent dans les pH nettement acides. A pH 1,01, le point d'inflexion correspond à + 0,440 volts, soit un rH de 17. Cette courbe typique d'un système réversible ne s'obtient qu'en milieu très acide. WURMSER attribue ce fait à l'instabilité des formes oxydées pour des pH plus élevés.

En extrapolant les mesures faites en milieu acide, WURMSER et LOUREIRO obtiennent pour un pH 7 à 20° une valeur d'environ 78 mv, ce qui fait un rH d'environ 16,7.

8° BEZSSONOFF, en 1935, en collaboration avec DELIRE et VAN WIEN, reprend sur l'acide ascorbique de SZENT GYÖRGYI, les mensurations de différences de potentiel en faisant varier la concentration de

5.10^{-5} N à 10^{-2} . Ils opèrent à une température voisine de 20° C. avec des solutions qui se trouvent en contact avec l'air et sans introduire d'oxydant. Quand l'âge de la solution ne dépasse pas deux heures et lorsque le pH est bas, la lecture du potentiel se fait facilement et peut être reproduite à volonté avec une approximation de ± 2 mv. En extrapolant, les auteurs trouvent que à la concentration de $1/2.000$ N et à pH 7, on a une différence de potentiel de 93 mv, ce qui fait un rH de 16,8 environ, valeur voisine de celle de WURMSER et LOUREIRO.

⁹⁰ BORSOOK, DAVENPORT, JEFFREYS et WARNER, travaillant au Laboratoire des Sciences biologiques de l'Institut de Technologie de Pasadena en Californie, reprennent ces études en 1937.

Les mesures sont faites au moyen de la technique par le vide déjà décrite et à $35^{\circ} 5$. La méthode consiste à mesurer des potentiels fournis par les électrodes en métal noble lorsque celles-ci sont immergées dans les solutions contenant des proportions connues des formes oxydées et réduites de l'acide ascorbique. On fait des mélanges de forme réduite et de forme oxydée d'acide ascorbique dans des solutions-tampons citrate-phosphate, à des pH variant entre 2,04 et 6,43. La forme oxydée est préparée par oxydation de l'acide ascorbique par l'iode. Le spécimen d'acide ascorbique employé donne une valeur de titration de 100 %, en prenant comme base que 1 molécule d'acide ascorbique exige pour son oxydation deux équivalents d'iode. Toutes les solutions utilisées sont maintenues à la température de la glace et sont débar-

rassées de l'air contenu par passage d'azote. Les différents mélanges sont préparés immédiatement avant le transfert dans le récipient de l'électrode. Elles sont débarrassées de leurs gaz au moyen d'une pompe à huile pendant trois minutes, à la température du laboratoire, puis pendant deux minutes à 35°. Pendant l'évacuation à la température du laboratoire, la solution se refroidit. On emploie des électrodes de platine en lame. On obtient les mêmes résultats, d'ailleurs, avec des électrodes uniquement en platine ou avec des électrodes d'or platiné. Le récipient qui sert d'électrode est agité continuellement dans un bain d'air maintenu à 35°5. Des lectures sont faites à de fréquents intervalles, jusqu'à ce qu'un potentiel stable soit obtenu, ou jusqu'à ce qu'on observe une évolution régulière du potentiel.

L'équation de l'électrode est obtenue comme précédemment. Elle est la suivante :

$$E_{\text{obs}} = \bar{E} - \frac{RT}{F} \text{pH} - \frac{RT}{2F} \ln \frac{(\text{f. red})}{(\text{f. ox})} - \\ \frac{RT}{2F} \ln \frac{K_r}{K_o} - \frac{RT}{2F} \ln \frac{K_o + (H^+)}{K_r + (H^+)}$$

Dans cette équation, les expressions réduit et oxydé indiquent la concentration des formes réduites et oxydées. K_r et K_o sont les premières constantes de dissociation de la forme réduite et de la forme oxydée, l'acide ascorbique étant considéré ici comme acide monovalent pour simplifier. $\text{p}K_r$ a une valeur d'environ 4,17 (d'après BIRCH et HARRIS et d'après KARRER). Par une titration colorimétrique, BORSOOK et ses collaborateurs

trouvent à pK_o une valeur approximative de 9. La valeur de n est de 2, ce qui est indiqué par titration au moyen de l'iode.

Les résultats doivent être divisés en deux groupes : les trois résultats du côté le plus acide (à pH 2,04 ; 2,68 ; 3,3) pour lesquels le potentiel atteint des valeurs stables, et les mensurations faites à des pH moins acides (4,01 ; 4,65 ; 5,31 ; 5,75 ; 6,43) pour lesquelles le potentiel n'atteint pas des valeurs stables. Dans ce dernier groupe, après un changement rapide négatif, le potentiel change lentement, et suit enfin une évolution uniforme pendant des heures, le rapport $-dE/dt$ qui traduit le changement de potentiel en fonction du temps, dans chaque cas, est alors constant. L'ampleur de cette constante est plus grande au fur et à mesure que le pH augmente.

La caractéristique du premier groupe est que plusieurs heures sont nécessaires avant qu'un potentiel stable soit atteint. Une fois atteint, les différences qui s'établissent entre les valeurs des divers mélanges sont suffisamment proches des différences théoriques correspondant aux divers rapports forme réduite/forme oxydée pour permettre de soutenir la conclusion qu'il s'agit de potentiels thermodynamiquement réversibles. Cette conclusion est en outre confirmée par le fait que les valeurs de E'_o tombent sur la courbe théorique calculée d'après l'équation de l'électrode (E'_o est le potentiel calculé pour un pH indiqué, lorsque le rapport forme réduite/forme oxydée = 1). Les valeurs dans cette région du pH (de pH 2 à

pH 3,3) sont semblables à celle de WURMSER et LOUREIRO.

Le second groupe d'expériences ne donne pas directement la valeur des potentiels thermodynamiques réversibles. De telles valeurs sont obtenues d'après l'hypothèse que : 1° la chute constante qui caractérise ce groupe est le résultat d'un changement irréversible de la forme oxydée (acide déhydroascorbique) en une autre forme oxydée, et à ce que 2° ce second changement est irréversible et constitue une réaction du premier ordre. Se basant sur cette seconde hypothèse, les auteurs concluent que : $d \log (\text{forme oxydée})/dt$ est une constante. En examinant l'équation de l'électrode, on voit que le potentiel E_{obs} est une fonction linéaire de $\log$ de la forme oxydée. Dès lors, $-dE_{\text{obs}}/dt$ sera par conséquent une constante. Ceci a été observé dans plusieurs cas. Les valeurs de E'_0 données par l'auteur sont obtenues sur la base des deux hypothèses formulées, en soustrayant du potentiel observé à chaque instant (pendant les intervalles durant lesquels $-dE_{\text{obs}}/dt$ est constant) le produit de la valeur de la constante $-dE_{\text{obs}}/dt$ par la durée (temps écoulé depuis le moment où l'acide ascorbique a été porté à 35°).

Les valeurs de E'_0 ainsi obtenues tombent sur la même courbe théorique ($E'_0 | \text{pH}$) que celles des groupes plus acides pour les changements de l'acide ascorbique prolongés par extrapolation. La courbe théorique E_0 a une pente, à pH 4,2, de 60 à 30 mv par unité pH. Les valeurs de E'_0 extrapolées tombent sur cette courbe à la fois dans les régions où la pente

est changeante et aussi dans la dernière portion droite de la ligne. Cette coïncidence est des plus frappantes, car la pente dans la région extrapolée est progressivement plus marquée avec l'augmentation du pH. A pH 6,43, la situation devient trop compliquée pour pouvoir être interprétée.

Voici les résultats trouvés par ces auteurs :

pH	E'.	— dE/dt
—	—	—
	mv	mv par heure
2,04	+ 0,283	0
2,68	+ 0,242	0
3,30	+ 0,205	0
4,01	+ 0,167	1,4
4,65	+ 0,137	1,9
5,31	+ 0,118	3
5,75	+ 0,108	5,9
6,43	+ 0,096	20,9

10° BALL, travaillant au Laboratoire de Chimie biologique de l'Université Johns HOPKINS (École de Médecine) de Baltimore, apporte en 1937 des résultats nouveaux.

Les procédés usuels de titration lui paraissent insuffisants. Les potentiels évoluent en donnant un plateau.

Leurs valeurs sont suffisamment proches des relations théoriques, mais elles s'établissent lentement à l'équilibre potentiel final. Dans les premières expériences réalisées

par BALL, il apparut que les titrations avec le ferricyanure en milieu tamponné à pH 3 donnaient un ajustement de l'électrode plus rapide que lorsqu'on employait d'autres agents d'oxydation ou d'autres tampons. Dans ces conditions, il paraissait possible d'obtenir une courbe de titration totale de l'acide ascorbique en bonne coïncidence avec la théorie. On peut penser que l'action favorable du ferricyanure est liée à sa décomposition facile. Ce résultat suggère la pensée d'un médiateur. Quand des médiateurs de caractéristiques connues sont introduits, un potentiel satisfaisant est atteint beaucoup plus rapidement. Il paraît évident que ce qui est nécessaire pour mesurer le système est la présence d'une petite quantité de substance active électromotrice. Quand ces substances sont en équilibre avec l'acide ascorbique, elles communiquent aux électrodes le potentiel caractéristique du système. Les médiateurs les plus favorables pour un tel but sont les indicateurs d'oxydo-réduction. Ainsi que le fait remarquer LEHMANN, si les potentiels recherchés sont ceux du système, les médiateurs ne doivent se trouver qu'en très petite quantité. Il est par ailleurs nécessaire que le potentiel des médiateurs soit proche de celui du système étudié.

Les résultats sont rapportés dans le tableau suivant :

Valeur de E'_0 et de E_h/t à des pH différents.

(Concentration de l'Acide ascorbique: 0,002 M. — Température 30°.)

Agent oxydant	Médiateur ajouté	pH	E'_0	$\frac{E_h}{t}$
			volts	mv par minute
Quinone	Indigotetrasulfonate	1,054	+ 0,3256	
$K_3Fe(CN)_6$	Pas d'indicateur	1,752	+ 0,2829	
—	—	2,156	+ 0,2600	
—	—	2,511	+ 0,2392	
—	—	2,698	+ 0,2266	
—	—	3,044	+ 0,2087	
Quinone	$CuSO_4$	3,046	+ 0,2106	
$K_3Fe(CN)_6$	Pas d'indicateur	3,391	+ 0,1882	
Quinone	Bleu de Méthylène	3,968	+ 0,1579	
$K_3Fe(CN)_6$	Pas d'indicateur	4,006	+ 0,1541	
—	Thionine	4,581	+ 0,1364	
—	Bleu de Méthylène	4,581	+ 0,1345	
Quinone	—	4,581	+ 0,1333	
—	Thionine	4,581	+ 0,1339	
—	—	5,188	+ 0,1148	0,02
$K_3Fe(CN)_6$	Pas d'indicateur	5,853	+ 0,0945	0,06
—	—	6,317	+ 0,0780	0,09
—	—	6,717	+ 0,0671	0,21
—	Thionine	7,238	+ 0,0512	1,6
Quinone	—	8,319	+ 0,0205	7,4
$K_3Fe(CN)_6$	—	8,566	— 0,0118	18,0

Les valeurs de E_0 portées dans ce tableau sont obtenues soit depuis une courbe de titration, soit par addition d'acide ascorbique et d'agent oxydant en quantité équivalente. Lorsque l'agent oxydant est le ferricyanure, il est souvent inutile d'ajouter un médiateur. On note au passage le fait que le sulfate de cuivre est un médiateur utile à pH 3, le fer est le seul métal lourd qui en dehors du cuivre puisse fonctionner comme un média-

teur. La série des valeurs rapportée à pH 4,58 montre que le résultat obtenu est indépendant à la fois du type d'agent oxydant et du médiateur utilisé. De même, BALL rapporte que trois échantillons d'acide ascorbique, d'origine, l'un, naturel, préparé par l'auteur, l'autre, naturel, envoyé par SZENT GYÖRGYI, et enfin, le troisième, d'origine synthétique, ont tous les trois donné les mêmes valeurs.

Une mesure de l'instabilité de la forme oxydée est donnée par la formule $-\Delta E_h/\Delta t$, dont les valeurs sont rapportées dans le tableau précédent en millivolts par minute.

Les valeurs rapportées sont établies pour un mélange équimoléculaire de la forme oxydée et de la forme réduite. Dans un tel mélange, une chute de potentiel d'environ 9 millivolts correspond à la disparition de la moitié de la forme oxydante originellement présente. Ainsi, la « demi-vie » de l'oxydant calculée en minutes peut être obtenue rapidement en divisant 9 mv par le quotient $-\Delta E_h/\Delta t$. C'est ainsi que par exemple, à pH 7,24; et à 30°, la demi-vie de l'acide déhydroascorbique est de 5 minutes. En dessous de pH 5, la disparition de l'acide déhydroascorbique est trop lente, elle ne permet pas de calcul.

Une mesure a été faite pour le système à 38° à pH 7,25. Dans ces conditions, la valeur de E'_0 est de + 0,0462 volts. La valeur de $-\Delta E_h/\Delta t$ est de 4,6 mv par minute. Cette valeur, pour E'_0 est de 5 mv plus basse que celle trouvée au même pH, mais à la température de 30°. Le taux de la disparition de l'oxydant a donc augmenté de trois fois pour

un accroissement de 8°. Un fait semblable a été constaté par l'auteur pour l'épinéphrine. La demi-vie de l'acide déhydroascorbique à 38° est à peu près de deux minutes.

Dans la région alcaline, l'acide déhydroascorbique devient si instable qu'aucune mesure ne peut être pratiquée par la méthode précédente. Cependant, l'auteur a fait des essais au moyen d'une méthode spéciale (appareil à écoulement). Les résultats n'amènent à aucune conclusion. Les meilleurs résultats sont obtenus quand un mélange d'oxydant et de réducteur est préformé dans une solution acide faiblement tamponnée, puis est jeté dans une solution alcaline tamponnée. Les résultats obtenus ne peuvent cependant être considérés que comme douteux. La disparition de l'acide déhydroascorbique paraît être accompagnée par la formation d'un produit plus fortement acide que son précurseur car les valeurs du pH deviennent rapidement plus acides.

L'équation de l'électrode, pour 30°, et pour un système situé entre pH 0 et pH 8,5, est la suivante :

$$E_h = E_o + 0,03006 \log \frac{[S_o]}{[S_r]} + 0,03006 \log [K_1 (H^+) + (H^+)^2]$$

S_o et S_r sont les concentrations moléculaires de la portion oxydée et de la portion réduite de l'acide ascorbique. Le potentiel normal est de + 0,3895 ; $K_1 = 9,1 \times 10^{-5}$ à 30°. Les différentes valeurs de potentiels étant exprimées en volts.

11° Il conviendrait d'analyser un travail de BECKER et DI GLERIA paru en 1937 dans le *Zeitschrift für Vitaminforschung*.

Nous n'avons malheureusement pas pu nous procurer ce travail, la Bibliothèque de l'Université de Lyon n'étant plus abonnée à ce périodique et les échanges universitaires de livres étant actuellement interrompus avec Paris. Nous devons nous contenter de rapporter sur ce travail quelques mots relevés dans un article de BEZSSONOFF : « BECKER et DIGLERIA ont cherché à établir un procédé de dosage de la Vitamine C basé sur la titration potentiométrique. Opérant en présence de l'air, ils commencèrent par établir des courbes de titrations électrométriques (potentiométriques) de la vitamine pure, oxydée graduellement par l'iode ou le dichlorophénol-indophénol. Le point d'inflexion de ces courbes, qui marque le potentiel d'équilibre de la vitamine à demi oxydée, correspond à un rH voisin de 21. »

Conclusions : Des recherches poursuivies au moyen de la méthode électrométrique on peut conclure que :

1° Si on plonge une électrode inerte dans une solution d'acide ascorbique, on développe une force électromotrice qui a une valeur bien définie pour des pH inférieurs à 4. Cependant, ces valeurs sont atteintes lentement ;

2° Si on ajoute un oxydant dans ces solutions à pH bas, on obtient des variations des valeurs de la force électromotrice développée. En portant en ordonnée ces valeurs et en abscisse les quantités d'oxy-

dant ajoutées, on obtient une courbe ayant la forme générale d'un S, forme caractéristique des systèmes réversibles. On peut en déduire les valeurs du potentiel normal pour chaque pH ;

3° Aux pH supérieurs à pH 4, les mensurations deviennent plus difficiles et bientôt impossibles. Cette difficulté provient du fait que l'acide ascorbique, après s'être oxydé, de façon réversible, subit une évolution rapide vers un autre produit d'oxydation, cette fois-ci non réversible.

Cependant, en augmentant la rapidité des lectures par l'adjonction de « médiateurs », ou en extrapolant, on arrive à apprécier le potentiel normal de la réaction réversible de l'oxydation de l'acide ascorbique à pH 7 et à 30°. Ce potentiel normal est d'environ 65 mv, correspondant à un rH de 16,2.

C. ÉTUDE DE L'OXYDATION DE L'ACIDE ASCORBIQUE PAR LES TECHNIQUES COLORIMÉTRIQUES

Certains corps ont deux couleurs différentes, l'une correspondant à leur forme réduite, l'autre correspondant à leur forme oxydée, parfois même, et ceci est avantageux, la forme réduite est incolore. On admet que le changement de teinte se fait au potentiel normal de ces corps, qui portent le nom d'« indicateurs ».

Si dans une solution inconnue nous introduisons un de ces indicateurs et que par tâtonnement (par la méthode de la fourchette comme pour le pH par exemple) nous déterminions l'indicateur qui se trouve à son demi-virage nous serons renseigné sur le rH de la solution.

CLARK nous a fait connaître une série d'indicateurs avec la valeur de leur potentiel normal pour les différents pH. Par ces méthodes colorimétriques, on a étudié l'acide ascorbique et l'on a obtenu les résultats suivants, que nous classerons en deux catégories.

I. Résultats obtenus en partant de la forme réduite de l'acide ascorbique :

Divers travaux sont à examiner :

1^o SZENT GYÖRGYI a étudié le potentiel de réduction de l'acide ascorbique à pH 7 au moyen des indicateurs de CLARK.

Les indicateurs n^{os} 1, 2, 3 ne sont pas réduits.

Le bleu de méthylène est lentement réduit.

L'indicateur n^o 4 est réduit rapidement.

2^o GEORGESCU utilise lui aussi la méthode de CLARK.

Il introduit des quantités aussi petites que possible des indicateurs dans les milieux dont il veut déterminer le potentiel d'oxydo-réduction. Le tableau suivant donne les valeurs de potentiel normal E'_0 pour les divers indicateurs employés par cet auteur. Ces données sont empruntées aux travaux de CLARK, de RAPKINE, de STRUYK. Les chiffres représentent en millivolts la valeur E'_0 à pH 7 pour chacun des indicateurs, ainsi que la valeur correspondante du rH.

<i>Indicateurs</i>	<i>E'.</i>	<i>rH</i>
2,6, dibromophénol-indophénol	0,217	21,3
Acide 1 naphtol, 2 sulfon., 2,6 di- chloro-indophénol	0,119	18,0
Violet de Lauth	0,062	16,0
Bleu de crésyle	0,032	15,1
Bleu de méthylène	0,011	14,4
Indigo-tétrасulfonate de sodium	— 0,046	12,5
Indigo-disulfonate de sodium	— 0,125	9,9
Bleu de Nil	— 0,142	9,2
Phénosafranine	— 0,242	5,7
Vert Janus	— 0,258	5,2

Pour réaliser leurs mensurations, les auteurs préparent une solution d'acide ascorbique dans un tampon de phosphate à pH 7. La solution ainsi préparée est répartie dans 5 tubes à essai, en mettant dans chaque tube 2 cm³ de la solution à 1 %. A chacun des tubes est ajoutée une quantité de colorant juste suffisante pour colorer la solution. Les colorants employés sont le violet de Lauth, le bleu de crésyle, le bleu de méthylène, le bleu de Nil et la phénosafranine. Les tubes sont scellés à la lampe après que le vide y a été fait. Puis ils sont gardés à 20°.

Les résultats sont les suivants ($E'_0 = 0,032$, $rH = 15,1$) : le violet de Lauth et le bleu de crésyle sont nettement décolorés, le bleu de méthylène l'est partiellement ($E'_0 = 0,011$, $rH = 14,4$). Le bleu de Nil et la phénosafranine ne le sont pas du tout. Les solutions

décolorées se recolorent instantanément lorsqu'elles sont agitées à l'air.

On se rappelle que les mensurations électrométriques avaient conduit ces mêmes auteurs à une valeur de $E' = 30$ mv, $rH = 15$ pour un pH 7 et à 20°. On voit qu'il y a coïncidence.

3° BORSOOK, DAVENPORT, JEFFREYS et WARNER reprennent cette étude en 1937.

Quand on étudie l'action réductrice des solutions d'acide ascorbique et d'acide déhydroascorbique au moyen de la méthode colorimétrique à des pH variant de 2 à 9, on voit clairement trois paliers d'oxydation. Le premier, qui correspond à la transformation d'acide ascorbique en acide déhydroascorbique, apparaît seul lorsqu'on se tient à des pH variant de 2 à 4. Le second, qui produit l'acide dicétogulonique instable. Cet intermédiaire se brise lorsque la réaction est alcaline, en acide thréonique et acide oxalique. Il peut être décelé quand on se tient à des pH variables entre 5,5 et 7,5, et si l'on part d'acide déhydroascorbique. Le troisième palier n'apparaît qu'en milieu alcalin. Il semble que l'acide qui résulte de cette oxydation soit l'acide thréonique.

La technique utilisée est la technique classique par le vide due à THUNBERG. On emploie une série d'indicateurs, allant de l'o-crésol-indophénol au violet de méthylène. On utilise la série de tampons de Mc ILVAINE, espacés à des intervalles de pH de 0,5, et allant de pH 2 à pH 9. On étudie pour chaque indicateur l'action réductrice à chaque pH. Le degré de réduction de l'indi-

cateur est apprécié par comparaison avec des solutions connues d'indicateurs sous leur forme oxydée. Quand la réduction n'est pas complète, on tient pour une valeur d'équilibre le degré de réduction qui reste invariable pendant 24 à 48 heures. On n'a pas besoin de plus de 2 à 3 jours pour atteindre cette valeur. On utilise les indicateurs suivants : o-crésol indophénol, thionine, bleu de méthylène, tetra-indigo, di-indigo, monosulfonate d'indigo, bleu brillant d'alizarine et violet de méthylène. Ces indicateurs sont ici énumérés dans l'ordre descendant de leur potentiel oxydo-réducteur. Ils sont dilués avec des solutions-tampons employées à une concentration finale de 0,00005 M. On pipette 2 cm³ de ces solutions, que l'on porte dans le compartiment inférieur de l'appareil de THUNBERG. On ajoute au-dessus 1 cm³ d'une solution aqueuse d'acide ascorbique, 0,005 M., ou d'acide déhydroascorbique. Quand on emploie de l'acide ascorbique, on ajoute de l'acide chlorhydrique et de l'iodure de potassium en quantité équivalente à l'acide iodhydrique présent dans la solution d'acide déhydroascorbique. L'appareil est vidé de son air, les solutions sont mélangées, puis portées au bain-marie. Pour chaque pH, on fait deux séries d'expériences, l'une à 37°, l'autre à 25°. Le taux de réduction est, bien entendu, plus lent à la plus basse température, mais par ailleurs, les résultats sont semblables. Les auteurs ne rapportent que les observations correspondant à la température de 37°.

Les résultats sont les suivants :

a) Premier palier d'oxydation : L'acide ascorbique

réduit rapidement et complètement l'o-crésol-indophénol et la thionine à tous les pH. Avec le bleu de méthylène, l'équilibre est atteint à pH 4,5, et avec l'indigotétrasulfonate à pH 2,5, pH 3, pH 3,5 et pH 4. Les valeurs de E' correspondantes sont : 0,235 mv, 0,206 mv, 0,155 mv, pour l'indigotétrasulfonate et 0,146 mv, pour le bleu de méthylène. A des pH plus élevés, la réduction de ces deux indicateurs est complète ou à peu près complète. Ceci est le résultat de l'action du pouvoir réducteur plus élevé des produits du changement irréversible de l'acide déhydroascorbique, celui-ci étant obtenu par l'action des indicateurs sur l'acide ascorbique.

Il n'y a qu'une réduction négligeable ou pas de réduction des indicateurs plus négatifs que l'indigotétrasulfonate.

b) Deuxième palier d'oxydation : Mesures colorimétriques du pouvoir réducteur des solutions d'acide déhydroascorbique.

Les solutions d'acide déhydroascorbique ne réduisent aucun indicateur, en 24 heures, si elles sont placées à un pH compris entre 2,5 et 4 inclus. A pH 4,5, les solutions d'o-crésol-indophénol de thionine, de bleu de méthylène et d'indigotétrasulfonate, de 5 à 10 %, sont réduites en 24 heures. Au-dessus de ce pH, la réduction de ces indicateurs est plus rapide ; l'o-crésol-indophénol est complètement réduit à pH 5 en 4 heures, à pH 6 en 45 minutes, à pH 7 en 6 minutes et à pH 8 en 3 minutes. La réduction de la thionine et du bleu de méthylène est cependant plus lente. A

pH 5 il faut, pour que la réduction de la thionine soit complète, 30 heures, et pour que la réduction du bleu de méthylène soit complète, 44 heures. A pH 6, le temps de réduction de ces deux indicateurs est 2 heures, 5 et 12 heures. A pH 7 il est de 57 minutes. A pH 8, il est de 0,4 et 14 minutes. Avec l'indigosulfonate, l'équilibre de réduction est obtenu à pH 5,5, 6 et 6,5. Les valeurs correspondantes de E'_0 sont + 0,15 mv, — 0,31 mv, — 0,68 mv. L'indigomonosulfonate n'est que très légèrement réduit, en 100 heures, à pH 6,5. Il est réduit de 75 % dans le même temps à pH 7 ; il est complètement réduit en 3 heures à pH 8, et en 5 minutes à pH 9. Le bleu brillant d'alizarine n'est pas réduit en-dessous de pH 7. A ce pH, la réduction est inférieure à 10 % en 10 heures ; elle est totale à pH 8 en 2 heures, à pH 9 en 25 minutes. Il n'y a pas de réduction du bleu de méthylène, même à pH 9.

Le premier point qui doit être noté est que ces observations apportent la preuve que l'acide déhydroascorbique peut devenir un agent réducteur. Cette propriété, qui apparaît à pH 4, devient de plus en plus intense au fur et à mesure qu'augmente le pH. Avec les indicateurs les plus positifs employés (o-crésol-indophénol), le temps de réduction, avec l'acide déhydroascorbique, est toujours plus grand qu'avec l'acide ascorbique. C'est ainsi que de pH 2,5 à pH 4, le temps est, dans un cas, infini, et dans l'autre cas, inférieur à une minute. A pH 5, il est égal à 100 dans un cas, inférieur à une minute, dans l'autre. A pH 6, il est égal à 45 dans un cas, inférieur

à une minute dans l'autre. A pH 7, il est égal à 6 dans un cas, inférieur à une minute dans l'autre. Enfin, à pH 8 il est égal à 3,5 dans un cas, inférieur à une minute dans l'autre.

Ces différences de réactivité des formes réduites et oxydées rendent possible le dosage de la Vitamine C au moyen de l'indophénol. Elles montent aussi pourquoi il est préférable de faire la titration à pH 2,5 plutôt qu'à un pH neutre ou voisin de la neutralité.

L'impossibilité, pour les solutions d'acide déhydroascorbique de ne réduire aucun des indicateurs à une acidité plus grande que celle qui correspond à pH 4 n'est pas uniquement due à ce que sa conversion en acide dicétogulonique est ici trop lente. L'acide dicétogulonique lui-même est inactif comme agent de réduction en-dessous de pH 4. Les auteurs ont fait des expériences dans lesquelles la transformation de l'acide déhydroascorbique en acide dicétogulonique était complète à pH 7,8 et 9. Les solutions étaient alors acidifiées ; elles ne possédaient alors aucun pouvoir réducteur.

Le second point est que le pouvoir réducteur des solutions d'acide déhydroascorbique coïncide (en tenant compte du pH auquel elles sont d'abord apparues et de leur développement avec l'accroissement du pH) avec la courbe de potentiel obtenue par les méthodes électrométriques et avec la perte des propriétés réductrices de l'hydrogène sulfuré. Ces trois faits attestent qu'un changement spontané s'est fait, changement portant sur l'acide déhydroascorbique. Le fait que cette dernière substance devient un

agent de plus grand pouvoir réducteur que l'acide ascorbique, est une nouvelle preuve que les changements irréversibles sont survenus. Ceci explique pourquoi l'acide ascorbique ne peut réduire les indicateurs qui sont par ailleurs, dans les mêmes conditions, réduits par des solutions qui initialement étaient formées d'acide déhydroascorbique (l'indigosulfonate à pH 7 par exemple). Si l'indicateur est trop négatif pour être réduit par l'acide ascorbique, on ne voit apparaître aucun acide déhydroascorbique, et par suite, il ne se forme aucun acide dicétogulonique.

Ainsi, on peut formuler ce second palier d'oxydation de deux façons. L'une va de l'acide dicétogulonique, à un intermédiaire qui se brise en milieu alcalin, pour donner de l'acide thréonique et de l'acide oxalique. L'autre va directement de l'acide dicétogulonique à l'acide thréonique et à l'acide oxalique. Les auteurs, se basant sur des expériences qu'ils ne publient pas faute de place, sont en faveur de la première de ces deux alternatives.

c) Troisième palier d'oxydation. A pH 9, les solutions d'acide déhydroascorbique réduisent complètement tous les indicateurs, excepté le violet de méthylène. La réduction complète de l'indigosulfonate et du bleu brillant d'alizarine ne peuvent pas être prévues par une extrapolation des valeurs d'équilibre obtenues avec l'acide déhydroascorbique transformé en acide dicétogulonique étudié par l'indigosulfonate à pH 5,5 et 6,5.

Les auteurs en concluent qu'il existe un troisième

palier d'oxydation. C'est l'oxydation d'un produit provenant lui-même de l'oxydation de l'acide dicétogulonique. Ils ne pensent pas qu'il s'agisse d'un autre type d'oxydation de l'acide dicétogulonique, c'est-à-dire d'un second stage d'oxydation différent du précédent.

Les auteurs, en face des incertitudes qui persistent, pensent qu'il convient de retenir seulement qu'il existe un palier plus négatif que le second.

II. Résultats obtenus en partant de la forme oxydée de l'acide ascorbique.

1^o WURMSER et LOUREIRO, en 1934, ont employé la forme oxydée de l'acide ascorbique, qu'ils ont ajoutée à l'indicateur utilisé sous sa forme de leuco-dérivé. Cette façon de procéder permettrait, d'après ces auteurs, de donner la preuve chimique la plus évidente de la réversibilité d'un processus oxydatif donné. Si le leuco-dérivé d'un colorant de potentiel très inférieur à celui du système étudié est quantitativement oxydé par une solution équivalente de la forme oxydée de ce système, on est sûr que l'oxydation est bien réversible et que la forme oxydée est stable pendant au moins le temps nécessaire à la réalisation de l'expérience. En outre, en opérant avec des leuco-dérivés de colorants dont les potentiels sont de plus en plus élevés, on arrive à serrer de très près le niveau du système à étudier, et même dans certaines conditions, à mesurer exactement son potentiel normal.

La technique est la suivante : dans des tubes en H, on place d'un côté le corps à étudier mélangé avec un oxydant et un tampon convenables, de l'autre côté le colorant dans le même tampon, et additionné d'un peu de palladium colloïdal. On doit choisir des concentrations telles que le rapport en équivalents du système et de l'indicateur soit connu, et que la concentration de celui-ci permette une mesure colorimétrique par comparaison avec des étalons ayant même épaisseur que la partie cylindrique du tube en H. Comme l'air contenu dans les solutions suffit à recolorer une quantité assez notable du leuco-dérivé, il est indispensable, avant de fermer l'appareil, de faire passer dans la solution de l'azote purifié pendant 15 minutes, tandis que, de l'autre côté, on prépare le leuco-dérivé en faisant passer de l'hydrogène. On fait ensuite le vide pendant 3 minutes et on scelle. Il faut compter 20 minutes pour réaliser une expérience avec l'assurance que les recolorations ne sont pas dues à l'oxygène contenu dans les solutions. Il serait donc difficile de mettre en évidence une forme oxydée dont la durée de vie serait inférieure à ce laps de temps.

Les auteurs étudient successivement :

a) Les potentiels des solutions d'acide ascorbique en milieu acide.

Ils introduisent dans des tubes de BORSOOK 1 cm³ de solution N/100 d'acide ascorbique, 1 cm³ de solution d'iode N/100 et 8 cm³ de tampon N/10. Les tubes sont mis à l'étuve à 35° et les mesures sont faites le jour suivant d'abord dans le thermostat, ensuite

après les avoir laissé refroidir pendant 2 heures à la température ordinaire. Les auteurs ont trouvé les valeurs suivantes :

pH	1,08	2,25	3,15
35°	0,333	0,267	0,214
23°	0,348	0,280	0,225

Les valeurs obtenues à 35° coïncident avec celles de BORSOOK et KEIGHLEY.

La détermination colorimétrique du potentiel normal conduit à des résultats réguliers quand on opère en milieu acide de pH 1 à pH 4. Le colorant qui se prête à ces mesures est le bleu de méthylène. Le tableau suivant indique les résultats :

pH	1,08	2,25	3,15	4,1
Réduction du bleu de méthylène	0,32	0,27	0,20	—
Recoloration du leuco- dérivé	—	0,25	0,20	0,17
Électrométrie	0,347	0,280	0,224	0,173

Il y a un accord satisfaisant entre les chiffres obtenus soit par réduction du bleu de méthylène, soit par recoloration de son leuco-dérivé, soit électrométriquement. Il n'offre aucun doute que l'acide ascorbique forme un système oxydoréducteur réversible dans le domaine d'activité en ions H^+ compris entre pH 1 et pH 4.

b) Les potentiels de l'acide ascorbique en milieu neutre.

1. Indications tirées de la vitesse de réduction des indicateurs :

Quand on fait le titrage par un indophénol (o-phénol-indophénol) d'une solution fraîche d'acide ascorbique dans un tampon moléculaire de phosphate à pH 7 en versant chaque fois une quantité de colorant correspondant à 1 atome d'hydrogène de la quantité d'acide ascorbique employée, on voit que le premier et le deuxième H des indophénols réagissent en 30 secondes environ. Le troisième et le quatrième H de l'acide ascorbique réduisent le colorant beaucoup plus lentement, soit en 2 heures environ. La discontinuité des deux vitesses est évidente. La même expérience peut être répétée, d'une part avec l'iode en présence d'amidon (réduction en 10 secondes et 2 heures), d'autre part avec un colorant à potentiel moins élevé que celui des indophénols, le bleu de toluyène (3 minutes et 4 heures) : la discontinuité est encore nette. Enfin, si on refait l'expérience avec du bleu de méthylène, la vitesse de réduction des quantités de bleu correspondant aux différents H n'offre plus cette brusque variation vers 2 H.

Si on répète les mêmes opérations en changeant les tampons, en prenant par exemple des phosphates très dilués (M/50) ou des tampons de véronal, on voit que la vitesse de réduction des 2 premiers H des colorants de potentiel élevé n'est pas changée, alors que la réduction du bleu de méthylène est retardée. L'oxyda-

tion du premier H par le bleu de méthylène, qui prenait quelques heures dans la solution moléculaire de phosphate, exige maintenant plusieurs jours. Il semble donc que l'oxydation par les colorants de potentiel inférieur à celui du bleu de toluyène se fasse après un remaniement moléculaire catalysé par les phosphates.

La différence si brusque entre le rythme de décoloration des colorants à potentiel élevé et celui du bleu de méthylène ne semble de prime abord explicable que si l'on admet que les 2 H du groupement énoïque de l'acide ascorbique forment un groupe réducteur, dont le potentiel est compris entre celui du bleu de toluyène et celui du bleu de méthylène, c'est-à-dire entre $+ 0,100$ et $+ 0,020$ volt à 20° C.

2. Mise en évidence de la réversibilité de l'oxydation de l'acide ascorbique en milieu neutre.

La technique est la même que celle utilisée en milieu acide. Pour avoir une idée de la quantité de forme oxydée présente, il convient de prendre un colorant ayant un potentiel négatif très grand. Dans ces conditions, la réaction est rapide et la proportion de leuco-dérivé est pratiquement équivalente à celle de la forme oxydée présente. Les auteurs se sont servis du bleu d'alizarine et surtout de la phénosafranine. Dans les deux cas, il y a une recoloration abondante du leuco-dérivé. Mais pour préciser le niveau du potentiel normal, il faut avoir recours à toute la série des indicateurs. Les résultats sont consignés

dans le tableau suivant, qui donne les proportions de leurs dérivés oxydés. La quantité de ces leuco-dérivés, ajoutée à la solution d'acide ascorbique est tantôt équimoléculaire (2 H), tantôt moitié moindre (1H).

pH	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0
1H Bleu de crésyle.					0,6	0,7	0,25	Trace	
Bleu de méthylène	0	0,05	0,1	0,7	0,8	0,25	0,01		
Tétrasulfonate d'indigo						0,8	Trace		
Trisulfonate ...							0,02		
2H Disulfonate d'indigo							0,4	0	
Bleu d'alizarine							0,6	0,1	0
Phénosafranine.							0,6	0,5	0,2
Méthylviologène									0,5

Il apparaît d'après ces données que, à pH 7, le leuco-dérivé du bleu de crésyle est partiellement recoloré. D'autre part, au même pH, le bleu de crésyle et la thionine oxydés ne sont pas complètement réduits au bout de 24 heures. La réduction de ces colorants que l'on observe après un temps beaucoup plus long, ne correspond plus à l'oxydation réversible des deux premiers H, mais à l'oxydation lente et irréversible qui porte sur 4 H.

Au contraire, le bleu de toluyène, ainsi que nous l'avons vu, est rapidement réduit. Le potentiel normal de l'acide ascorbique à pH 7 est donc certainement

compris entre $+ 0,045$ et $+ 0,100$ volt, à 20° C. Ce résultat est conforme à ce que l'on devait attendre puisque l'extrapolation des mesures effectuées en milieu acide indique $+ 0,078$ volt. La détermination directe par la méthode colorimétrique comme par la méthode électrométrique, est impossible en milieu neutre, à cause de l'instabilité de la forme oxydée.

3. *Durée de vie de la forme oxydée,*

On remarque sur le tableau ci-dessus que, à pH 7, le bleu de méthylène réduit n'est réoxydé que dans une proportion de 1 %, tandis que le bleu de crésyle l'est dans la proportion de 25 %. Ce fait est dû à la différence entre les vitesses de réoxydation des deux leuco-dérivés. La réoxydation du bleu de méthylène exige un temps tel que la forme oxydée a disparu en presque totalité avant de pouvoir être réduite. La même remarque s'applique à la série des indigos.

Enfin, l'impossibilité de réoxyder les indicateurs comme le bleu de méthylène et le bleu de crésyle ainsi que la réduction de la thionine et du bleu de crésyle dans les milieux de pH supérieur à 7 montre que l'instabilité de la forme oxydée augmente considérablement avec l'alcalinité. On peut d'ailleurs en donner la preuve directe par une mesure de la durée de vie de cette forme à divers pH.

A pH 4, la proportion de forme oxydée réversible présente dans la solution, déterminée par la recoloration du bleu de méthylène, diminue avec le temps et

est déjà très faible au bout de 10 jours à 22°, comme le montrent les résultats des dosages indiqués ci-dessous :

Temps	Pourcentage de forme oxydée présente
1 heure	100 %
24 heures	90 %
3 jours	50 %
10 jours	5 %

A partir de pH 6, la forme oxydée devient très instable. Pour déterminer la durée de vie à pH 7, les auteurs se sont servis du leuco dérivé de la phénosafranine.

Temps	Pourcentage de forme oxydée présente
20 minutes	60 %
1 heure	40 %
2 heures	10 %
24 heures	5 %

On voit que la forme oxydée réversible se détruit rapidement, bien qu'elle dure un temps suffisant pour qu'on ait pu déterminer son niveau avec assez d'exactitude. Après un temps très long, la plus grande partie est détruite, mais il en reste toujours une trace. Ceci suffit à expliquer la régularité des potentiels-limite observés par divers auteurs.

2° FRUTON, travaillant à l'université Columbia à New-York, en 1934, reprend cette question. Il trouve que dans la réaction qui se réalise entre l'acide ascorbique et certains indicateurs, la décoloration de ceux-ci évolue jusqu'à une valeur stationnaire. Pour déterminer si ces valeurs doivent être considérées comme en équilibre réel, le potentiel du système acide ascorbique est calculé d'après l'hypothèse d'une réversibilité thermodynamique.

Partant de la réaction :

Acide ascorbique + Indicateur oxydé. Acide déhydroascorbique + Leuco-dérivé, on a :

$$\frac{[D_o]}{[D_r]} \times \frac{[A_r]}{[A_o]} = K$$

D_o et D_r étant les formes oxydée et réduite de l'indicateur, A_o et A_r étant les formes oxydée et réduite de l'acide ascorbique.

Puisque l'oxydation et la réduction comportent la perte ou le gain de 2 atomes d'hydrogène, le potentiel caractéristique dépend du pH du milieu. En obtenant un pH constant, le dernier terme de l'équation :

$$E_h = E_o + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[S_o]}{[S_r]} - \frac{RT}{nF} \text{ pH}$$

est une constante confondue avec la constante E_o pour donner une nouvelle constante E'_o qui varie seulement avec le pH (les valeurs de E_p et de E_o étant exprimées en volts).

A l'équilibre, les potentiels des deux systèmes

partiels oxydo-réducteurs sont les mêmes, et dès lors l'on a :

$$E'_o(d) + 0,03 \log \frac{[D_o]}{[D_r]} = E'_o(a) + 0,03 \log \frac{[A_o]}{[A_r]}$$

ou :

$$\log \frac{D_o}{D_r} \times \frac{A_r}{A_o} = \log K \frac{E_o(a) - E_o(d)}{0,03}$$

dans lesquelles $E'_o(a)$ et $E'_o(d)$ sont respectivement les potentiels caractéristiques de l'acide ascorbique et du système des indicateurs. Puisque deux équivalents participent à la réaction, le facteur 0,03 doit être appliqué.

Dès lors, si le système est réversible, les différents indicateurs donneront un équilibre qui au même pH donnera les mêmes valeurs de potentiel que le système étudié. Par ailleurs, si le rapport des concentrations des agents qui réagissent est modifié, les relations d'équilibre sont troublées dans une proportion définie par ces considérations basées sur la loi d'action de masse.

Pour apporter une preuve complémentaire que ces valeurs stationnaires correspondent à un véritable équilibre, il est encore nécessaire que la forme oxydée de l'acide ascorbique réagisse avec la forme leuco-dérivé des indicateurs. On peut obtenir des équilibres entre des corps tels que ces deux réactions inverses, partant l'une de l'acide ascorbique, l'autre de son produit d'oxydation donnent les mêmes potentiels.

La méthode utilisée par les auteurs est la suivante :

Il convient tout d'abord de s'assurer d'une absence complète d'oxygène moléculaire. Pour cela, FRUTON utilise en tube de THUNBERG modifié. Il chasse complètement l'oxygène en évacuant, puis en remplissant alternativement le tube avec de l'azote pur, puis en maintenant une pression positive d'azote pendant toute l'expérience (l'azote était purifié par passage sur du cuivre chauffé à 150°). Les tampons sont privés d'air, maintenus sous azote pur, et balayés avec de l'azote avant d'être ajoutés à l'appareil de THUNBERG, dans des conditions anaérobies. Le tampon est introduit après que le tube contenant l'indicateur et l'acide ascorbique a été vidé, puis rempli d'azote. Le volume total de la solution-tampon doit être de 10 cm³, le tube est maintenu sous l'eau dans un thermostat réglé à 25° ; la forme du tube permet de suivre les changements dans l'intensité des couleurs quantitativement au moyen du photomètre de PULFRICH. On utilise le filtre correspondant à l'absorption maximum de l'indicateur. Lorsqu'il convient de faire agir l'acide ascorbique sur des leuco-dérivés, l'auteur utilise un appareil qui permet la réduction des indicateurs et le transfert du leuco-dérivé dans le vase de réaction sans oxydation par l'air. Ceci est obtenu grâce à une pipette à vide de KUHNAU. Dans ces expériences, le tampon est introduit aussi de façon anaérobie dans le tube qui contient déjà l'acide ascorbique. Le leuco-dérivé de l'indicateur préparé au moyen de l'hydrogène et de mousse de platine est ajouté à la fin. Une mesure de la qualité de cette méthode est donnée par le fait qu'une solution de

leuco-dérivé de bleu brillant d'alizarine change sa transmission pour seulement 1,5 %, quand il est placé dans les conditions précédentes, sans acide ascorbique, pendant une période d'une semaine.

L'acide ascorbique employé était préparé par SZENT GYÖRGYI. Une solution standard est préparée en dissolvant 17,6 milligr. d'acide ascorbique dans 10 cm³ d'acide chlorhydrique 0,1 N. On obtient ainsi une solution de 0,01 M. Elle est conservée sous azote.

La solution d'acide ascorbique oxydée est obtenue en oxydant 8 milligr. 8 d'acide ascorbique avec la quantité théorique (1 cm³) d'iode N/10. Une quantité égale de nitrate d'argent N/10 est ajoutée. On centrifuge l'iodure d'argent formé et le liquide surnageant est porté à 25 cc. La concentration de cette solution est de 0,002 M.

Les indicateurs employés sont des échantillons commerciaux cristallisés d'indigotétrasulfonate et d'indigodisulfonate. On prépare des solutions standard d'une concentration de 0,001 M. Avec un peu de pratique, la comparaison des intensités au spectrophotomètre donne une précision à 0,2 % près.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Le calcul des potentiels des systèmes d'acide ascorbique depuis les valeurs d'équilibre obtenues au moyen des indicateurs précédents, donne des résultats qui, pour un pH donné, sont identiques. En outre, ils sont indépendants des rapports de la concentration. La réversibilité thermodynamique du système est encore montrée par la réaction de l'acide déhydroascorbique avec le leuco-indigotétrasulfonate, ceux-ci étant dans

un rapport de concentration de 1 à un pH 7,3. L'équilibre est atteint en 10 minutes. L'indicateur est oxydé dans la proportion de 3,1 $\frac{1}{2}$. En calculant depuis cette valeur, le potentiel du système d'acide ascorbique à pH 7,3, on a — 0,078 volt. Ce chiffre est approximativement plus positif de 15 mv que celui obtenu dans la direction inverse. La différence est due sans doute à une élimination imparfaite de l'oxygène. Le tableau suivant traduit les résultats obtenus.

POTENTIELS D'ACIDE ASCORBIQUE.

Indicateur	pH	Rapport acide ascorbique à indicateur	Temps nécessaire	Équilibre de concentration de l'indicateur		E'° (d)	E'° (a)
				Forme oxydée	Forme réduite		
			Jours	p. 100	p. 100	volt	volt
Indigotétratsulfonate ..	5,74	2 : 1	18	18,0	82,0	0,021	0,006
	6,28	5 : 1	4	3,5	96,5	— 0,012	— 0,036
	6,66	2 : 1	15	10,7	89,3	— 0,030	— 0,055
	6,67	1 : 1	15	25,5	74,5	— 0,030	— 0,055
	7,31	2 : 1	5	6,8	93,2	— 0,059	— 0,091
Indigo-disulfonate.....	5,65	10 : 1	6	60,4	39,6	— 0,048	— 0,001
	6,53	20 : 1	3	39,4	60,6	— 0,100	— 0,060
	7,07	20 : 1	1,8	38,1	61,9	— 0,130	— 0,091
	7,24	10 : 1	1,2	55,1	44,9	— 0,140	— 0,098

Ainsi, grâce à l'usage des indicateurs, l'acide ascorbique apparaît comme constituant un système réversible entre pH 5,5 et pH 7,5. Le potentiel de l'acide

ascorbique à pH 7 est = — 0,081 volt. Enfin, le taux de l'oxydation du leuco-indigotétrasulfonate par l'acide déhydroascorbique est plus grand que le taux de sa réduction par l'acide ascorbique.

Conclusions : Si l'on admet deux paliers d'oxydation, les valeurs trouvées par les différents auteurs depuis 5 ans environ paraissent coïncider heureusement. Ce tableau, relevé dans BORSOOK, DAVENPORT, JEFFREYS et WARNER, résume ces conclusions et précise les différentes valeurs du potentiel normal de l'acide ascorbique.

POTENTIELS D'OXYDO-RÉDUCTION RÉVERSIBLES
DE L'ACIDE ASCORBIQUE.

Rapport entre :

E'_0 et le pH

pH	Premier palier d'oxydation			Deuxième palier d'oxydation	
	Méthode électrométrique		Méthode colorimétrique 37 °, BORSOOK, DAVENPORT	35°, BORSOOK, DAVENPORT	25°, FRUTON
	35°, BORSOOK, KEIGHLEY	30°, BALL			
2,5	0,252	0,242	0,235		
3,0	0,223	0,212	0,206		
3,5	0,193	0,184	0,185		
4,0	0,166	0,158	0,155		
4,5	0,145	0,136	0,146		
5,0	0,127	0,118			
5,5	0,112	0,102		0,015	0,019
6,0				— 0,031	— 0,021
6,5				— 0,068	— 0,051

**D. ÉTUDE DE L'OXYDATION
DE L'ACIDE ASCORBIQUE
PAR LES TECHNIQUES CHIMIQUES**

Nous laisserons de côté systématiquement dans ce paragraphe l'oxydation par l'oxygène moléculaire, qui fera le sujet du prochain chapitre. Nous envisagerons par contre successivement l'oxydation par :

1^o L'iode. SZENT GYÖRGYI rapporte le premier, en 1928, l'expérience suivante : Une petite quantité d'acide ascorbique est dissoute dans l'eau. 1 cm³ de cette solution réduit 1 cm³ 3 d'iode 1/100. Trois nouveaux prélèvements de la même importance et de la même solution sont portés dans trois fioles d'Erlenmeyers. A chacun d'eux on ajoute une goutte d'amidon. Dans le premier on ajoute en outre une solution d'iode jusqu'à coloration bleue. On réduit l'excès d'iode par une trace d'acide ascorbique. A chacun d'eux on ajoute du bleu de thymol, puis aux deux prélèvements non oxydés on ajoute de l'acide chlorhydrique 1/100 jusqu'à ce que leur bleu de thymol ait la même teinte que celui du premier. Les quantités d'acide chlorhydrique ajouté sont de 1 cc. 25 en moyenne. Pour chaque atome d'iode ajouté, il s'est donc formé une molécule d'acide iodhydrique. L'oxy-

dation de l'acide ascorbique consiste donc dans l'enlèvement de deux atomes d'hydrogène.

KARRER, SALOMON, MORF et SCHOP, en 1932, ont réalisé les expériences suivantes : Ces auteurs essaient d'isoler le produit de l'oxydation obtenu au moyen de l'iode. Pour cela, à une solution aqueuse d'acide ascorbique, ils ajoutent une quantité exactement calculée d'iode dissous dans du chloroforme. En agitant, cet iode disparaît immédiatement. La couche aqueuse incolore est alors séparée et portée dans le dessiccateur à vide à la température du laboratoire. Quand la solution a atteint une certaine concentration, il se produit une dissociation, avec libération d'iode. Lorsque tout le solvant est évaporé, il reste à côté de traces d'iode, de l'acide ascorbique cristallisé, présentant toutes les caractéristiques de la Vitamine C naturelle et donnant à l'analyse quantitative les chiffres suivants : C = 40,92 % ; H = 4,54 %.

Ainsi, la réaction qui fait de l'acide iodhydrique à partir de l'iode et de l'acide ascorbique, s'inverse dans le vide et peut régénérer l'acide ascorbique.

Ces mêmes auteurs montrent en outre qu'en titrant l'acide ascorbique avec de l'iode, en solution alcaline, on obtient une substance qui ne réduit plus la solution de FEHLING et dont la formation correspond à une consommation de 4 atomes d'iode. On a donc, là encore, deux paliers d'oxydation, l'un qui correspond à l'utilisation de deux atomes d'iode, l'autre qui correspond à l'utilisation de 4 atomes.

2° L'acide phosphomolybdique $H^3 PO^4 12 Mo O^3$

+ 6 H₂ O est réduit par l'acide ascorbique. BEZSSONOFF et M^{me} WOLOSZYN travaillant au Laboratoire de Clinique infantile de la Faculté de Médecine de Strasbourg en 1938, ont montré que l'on obtient deux colorations :

a) Une coloration bleue qui correspond aux concentrations réciproques suivantes des produits qui réagissent :

Pour 2 molécules d'acide ascorbique il faut :

En solution acétique à 5 % : 3 mol. d'acide phosphomolybdique ;

En solution KCl + HCl : 6 mol. d'acide phosphomolybdique ;

En solution PO⁴KH² — PO⁴H³ : 15 mol. d'acide phosphomolybdique ;

En solution citrique : 1.680 mol. d'acide phosphomolybdique.

Quand on abaisse le pH, la quantité de l'oxydant nécessaire pour obtenir la réaction bleue maximum devient plus importante. Si l'on défèque le produit coloré sans utiliser de réducteur, après défécation, le filtrat accuse encore une teneur notable en acide ascorbique non oxydé. La portion oxydée est régénérée par l'hydrogène sulfuré.

On obtient une même coloration bleue avec l'hydroquinol, mais en solution acétique à 5 % (pH 2,35), il faut ici 160 molécules d'hydroquinol pour 3 molécules d'acide phosphomolybdique.

Par ailleurs, on sait que lorsque la concentration

moléculaire de l'hydroquinol dépasse de 80 fois celle de l'acide ascorbique, les valeurs des potentiels des deux solutions se trouvent très rapprochées. Une électrode de platine, plongée dans les deux solutions donne, respectivement :

Avec la solution acide ascorbique :

$$25 N 10^{-5} = 490 \text{ mv} ;$$

Avec hydroquinol : $2.000 N 10^{-5} = 520 \text{ mv}$.

La réaction bleue correspond donc à un premier niveau d'oxydation.

b) Une réaction verte qui correspond aux concentrations suivantes des produits qui réagissent :

Pour 2 molécules d'acide ascorbique, il faut en solution acétique à 5 % (pH 2,35), 7 molécules d'acide phosphomolybdique.

Si on défèque le produit coloré, sans utiliser de réducteur, la solution filtrée est absolument exempte d'acide ascorbique. Celui-ci est donc entièrement oxydé.

L'acide oxydé est entièrement retransformé en acide ascorbique par l'hydrogène sulfuré. Il s'agit donc là encore d'acide déhydroascorbique. L'oxydation est réversible et totale. L'hydroquinol, lorsqu'on augmente son rapport 3/160 avec l'acide phosphomolybdique, donne lui aussi un virage au vert.

Les auteurs concluent de ces recherches qu'il existe pendant l'oxydation de l'acide ascorbique, comme

pendant l'oxydation de l'hydroquinol, deux niveaux d'oxydation. La réaction bleue est conditionnée par un potentiel oxydo-réducteur inférieur à celui qui provoque la réaction verte.

3° HERBERT et ses collaborateurs, en 1933, signalent l'oxydation possible par l'ozone.

4° Ces mêmes auteurs signalent encore l'oxydation par le permanganate de potasse.

5° SZENT GYÖRGYI, en 1928, signale la réduction du nitrate d'argent en milieu neutre ou acide et GIROUD et LEBLOND en 1934 utilisent une solution de ce sel à 10 % acidifiée par 1 % d'acide acétique pour des essais de détection histologique.

6° L'acétate de cuivre est lui aussi réduit.

7° L'acide ascorbique réduit facilement le ferricyanure de potassium en donnant du ferrocyanure. Nous avons vu que dans l'établissement des courbes d'oxydation, soit par la méthode colorimétrique soit par la méthode électrométrique, c'est le ferricyanure qui est l'agent oxydant le plus souvent employé.

La méthode de dosage de l'acide ascorbique de TAUBER et KLEINER repose sur une réduction du ferricyanure.

8° L'acide phosphotungstique est lui aussi réduit.

9° Un réactif phosphomolybdique dont la formule de préparation est due à BEZSSONOFF, est réduit. Cette réduction constitue le principe d'un dosage.

10° Le 2-6 dichlorophénol-indophénol est réduit. Il passe de la coloration bleue en solution neutre ou alcaline, rouge en solution acide, à sa leuco-base phénolique incolore. Sur cette réaction repose la méthode de dosage de TILLMANN'S.

11°, SZENT GYÖRGYI a, dès 1928, montré que l'acide ascorbique réduit très rapidement la liqueur de Fehling à la température du laboratoire.

12° MOREL et MARTHOUD en 1935 ont montré que l'acide *l*-ascorbique réduit plus intensément et plus rapidement que les oses l'*o*-dinitrobenzène en milieu alcalin, avec formation de sel violet de l'*o*-nitrophényl-hydroxylamine : ce qui a été confirmé après par Richard KUHN.

Conclusions : L'étude de l'oxydation de l'acide ascorbique par les techniques chimiques, confirme donc la notion de deux paliers d'oxydation, l'un correspondant à la perte de deux atomes d'hydrogène, l'autre à la perte de 4 atomes d'hydrogène.

**E. L'EXPRESSION DE CES OXYDATIONS
D'APRÈS LES FORMULES DE CONSTITUTION
DE L'ACIDE ASCORBIQUE
ET DE SES PRODUITS D'OXYDATION**

La formule de l'acide ascorbique a été élucidée à la suite de travaux poursuivis dans les Laboratoires de KARRER à Zurich, de VON EULER, de MICHEEL et KRAFT à Göttingen. Elle peut s'établir par les raisonnements suivants que nous rapportons d'après HAWORTH et HIRST :

1^o Formule élémentaire :

SZENT GYÖRGYI a établi la formule élémentaire de ce corps qui est $C^6H^8O^6$. (Le point de fusion étant de $192^{\circ}C$ et son activité optique en solution aqueuse étant de $[d]^D = + 23^{\circ}$.)

Il donne des sels bien définis du type $C^6H^7O^6 M$.

2^o Les groupes hydroxyles (caractère énolique de deux de ces groupes) :

La molécule d'acide ascorbique contient quatre groupements hydroxyle. Deux d'entre eux sont convertibles en groupe méthoxyle par l'adjonction de diazo-

méthane (CH_2N_2). Ils ont par conséquent un caractère énolique. Les deux autres sont des groupes hydroxyls alcooliques normaux. Ils se combinent avec une molécule d'acétone en donnant naissance à un dérivé isopropylidène, dans lequel les deux hydroxyls énoliques sont encore présents. L'acide ascorbique se combine facilement avec la phénylhydrazine et avec de nombreuses phénylhydrazines substituées, donnant un produit qui a la composition des osazones. Ces réactions montrent la présence dans la molécule d'acide ascorbique d'au moins un groupe cétonique capable de supporter l'énolisation. L'étude du spectre d'absorption confirme ces conclusions. Il montre une bande unique intense, à 2.450 A° en solution acide, qui passe à 21.650 A° en solution neutre. L'intensité de l'absorption est due sans doute à des doubles liaisons conjuguées. Il y a probablement dans cet acide un groupe situé de telle façon que l'énolisation de la fonction CO donne naissance à un système conjugué de doubles liaisons.

3° Structure générale de la chaîne carbonée.

L'acide ascorbique peut être transformé en presque totalité en furfural. Il s'agit donc probablement d'une molécule contenant une chaîne linéaire de 6 atomes de carbone avec aucune chaîne latérale branchée sur cette chaîne principale. Sur cette base, on peut concevoir un grand nombre de formules structurales. Une propriété importante, connue depuis longtemps, en limite cependant le nombre. Cette propriété est la nécessité inhabituelle qu'a cette molécule d'avoir une

forme plate ; ce fait a été découvert par Cox à la suite d'études cristallographiques et d'études de spectrogrammes de Rayons X. Grâce à cette propriété, le nombre des formules possibles devient beaucoup moins élevé ; en particulier, on ne peut imaginer aucune formule contenant un groupe acide carboxylique et se trouvant en même temps en accord avec les exigences chimiques et cristallographiques.

4° Constitution stéréochimique. (Les produits extrêmes de l'oxydation.)

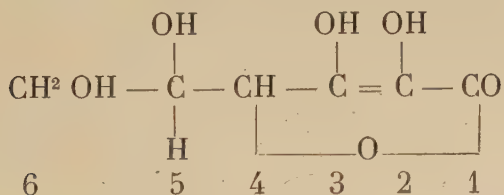
La solution du problème vient d'une étude détaillée de ses produits d'oxydation.

Quand la première oxydation réversible est réalisée, la molécule qui en résulte et qui contient le groupe — CO — CO — peut encore subir une nouvelle oxydation par l'hypoiodite de sodium en solution alcaline. Deux substances sont obtenues en quantité presque théorique. Celles-ci sont respectivement l'acide oxalique et l'acide thréonique. (L'identité de cette dernière substance étant établie par sa transformation en triméthyl-l-thréonamide, par méthylation avec transformation ultérieure en amide, d'une part, et en acide d-tartarique, d'autre part, reconnu à son dérivé caractéristique, le diméthoxy d-succinamide, par oxydation au moyen de l'acide nitrique.) Ces résultats établissent la relation stéero-chimique entre l'acide ascorbique et le l-gulose, dont il se révèle comme étant dérivé. En même temps, ces caractères apportent une preuve montrant que le produit de la première oxyda-

tion de l'acide ascorbique est capable de réagir comme un sel d'acide dicétonique.

5° **Constitution lactonique.** (Le premier produit d'oxydation) :

Au moment de leur formation, le produit d'oxydation primaire réversible et l'acide, ascorbique ne possèdent pas la propriété acide, mais sont une lactone qui développe ses fonctions acides quand l'anneau lactonique s'ouvre. Cette ouverture se réalise simplement en maintenant la substance en solution aqueuse. Il s'ensuit que la nature acide de l'acide ascorbique n'est pas due à la présence d'un groupe carboxyl libre, mais est conditionnée par un groupe énolique hydroxylique. Dès lors, la relation entre l'acide ascorbique et son premier produit d'oxydation devient claire. L'acide ascorbique est une lactone dans laquelle le groupe dicétonique — CO — CO — est remplacé par un groupe diénolique — C(OH) = C(OH) —. Par exemple, si le premier produit d'oxydation est une γ lactone, l'acide ascorbique a alors la structure suivante :



Dès lors, il y a intérêt à déterminer exactement la forme de l'anneau lactonique.

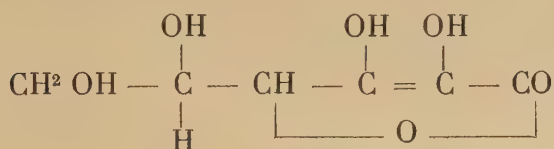
Il paraît donc dès à présent que la formule de l'acide ascorbique est établie. C'est ainsi que l'a annoncé HIRST en 1933, une lactone d'un acide 2- céto *l*-gulonique, capable de réagir en donnant différentes modifications tautomériques variées.

Dans le but de déterminer la nature de l'anneau lactonique on protège d'abord tous les groupements hydroxyles libres. Le dérivé tétraméthylé de l'acide ascorbique ainsi obtenu est alors traité par l'ozone. On obtient alors la démonstration de la position de l'attache lactonique. MICHEEL montre que le dérivé diméthylé de l'acide ascorbique, dérivé dans lequel sont seulement méthylés les deux groupes énoïques, donne un dérivé di- *p*- nitrobenzoyl. Ce dernier réagit avec l'ozone en donnant un éther neutre contenant le même nombre d'atomes de carbone que le matériel non oxydé. Il s'ensuit que la double liaison attaquée par l'ozone doit être située dans un anneau, mais les produits obtenus par hydrolyse de l'éther neutre, à savoir l'acide oxalique et l'acide thréonique, ne permettent pas de déduction concernant la mesure de cet anneau.

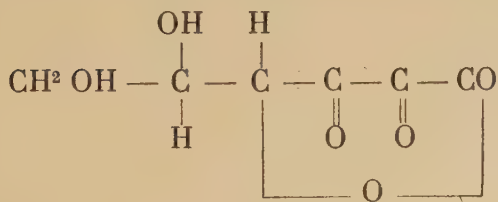
Une même méthode d'oxydation, appliquée à l'acide ascorbique entièrement méthylé, donne tous les renseignements au sujet de la nature de l'anneau : l'acide ascorbique diméthylé est facilement transformé en dérivé tétraméthylé sous l'action de l'oxyde d'argent et de l'iodure de méthyle. Le traitement par l'ozone donne naissance à un éther neutre. Celui-ci à son tour réagit avec l'ammoniaque en donnant une oxamide et l'amide de l'acide 3 : 4 -diméthyl -*l*-thréo-

nique. La présence d'un groupe hydroxyl dans la position γ dans cette dernière substance est démontrée par l'observation que l'amide donne une réaction de WEERMAN très positive. (La réaction de WEERMAN consiste à former un cyanate de sodium par l'action de l'hypochlorite de soude sur une amide') Dès lors il semble que l'anneau lactonique, dans l'acide ascorbique est attaché à l'atome de carbone, qui porte le groupe hydroxyl dans l'acide l-thréonique méthylé obtenu par oxydation. Puisque par ailleurs on sait que le quatrième anneau de l'acide ascorbique original est justement celui qui porte ce groupement hydroxylique, il s'ensuit que l'acide ascorbique contient bien un anneau γ lactonique.

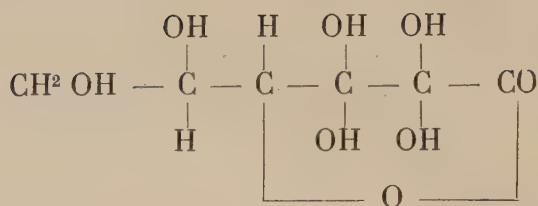
Dès lors, les formules de l'acide ascorbique et de ses dérivés d'oxydation peuvent s'écrire ainsi :



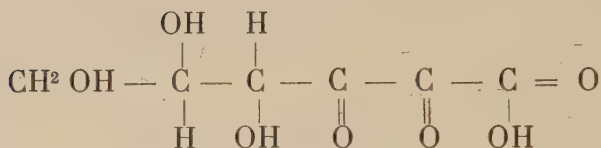
Acide *l*-ascorbique.



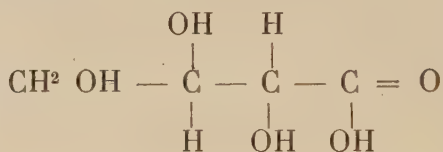
Acide déhydrascorbique.



Acide dehydro-ascorbique. à l'état des groupes cétoniques.



Acide 2,3 -dicéto-*l*-gulonique.



Acide *l*-thréonique.



Acide oxalique.

6° L'acide déhydroascorbique :

L'acide déhydroascorbique a une formule brute de $\text{C}^6\text{H}^6\text{O}^6$ déterminée par KARRER. Son anneau lactonique s'ouvre assez rapidement en solution aqueuse.

Il revient facilement par réduction à l'acide ascorbique tant que sa chaîne lactonique n'est pas ouverte. Cette réduction peut être obtenue par l'hydrogène sulfuré ou par évaporation en présence de l'acide iodhydrique. L'ouverture de la chaîne lactonique, qui rend le retour à la forme biénolique moins facile, car il n'a lieu qu'en présence d'acide iodhydrique, est sans doute à l'origine des modifications du spectre d'absorption, de la rotation et d'autres propriétés physiques que l'on observe pendant les processus d'équilibration en solution aqueuse. En milieu neutre ou alcalin, une mutarotation rapide et importante est observée et aucune régénération de l'acide ascorbique n'est alors possible par réduction.

Nous avons vu sa constitution en établissant celle de l'acide ascorbique. Ajoutons que la méthode de TEREWITINOFF a montré que l'acide dehydroascorbique a seulement 2 hydroxyls en opposition avec l'acide ascorbique qui en a 4.

7° Le support de la fonction vitaminique.

L'identité de l'acide ascorbique et de la vitamine C repose sur une série de démonstrations, dont la plus importante est que l'acide *l*-ascorbique synthétique, préparé avec un matériel complètement inactif, a précisément le même degré d'activité physiologique que l'acide ascorbique isolé des sources naturelles.

Parmi les substances voisines de l'acide ascorbique comme parmi celles qui en dérivent, une seule de celles qui n'ont pas d'anneau est active sur le scor-

but. C'est le méthyl -2- céto-*l*-gulonate. Il est probable que ce corps est converti dans l'organisme en acide ascorbique.

De l'examen de la formule de constitution des substances actives, il résulte que seules sont anti-rachitiques celles qui ont une formule telle que le 5^e élément de l'anneau lactonique se trouve à droite de la chaîne carbonique quand la formule est écrite selon les conventions de FISCHER. L'hydroxyl attaché à C⁴ doit donc être à droite.

CHAPITRE II

L'oxydation de l'acide ascorbique par l'oxygène moléculaire, en présence de divers ions et de certaines molécules.

(Travaux personnels.)

L'oxydation de l'acide ascorbique par l'oxygène moléculaire a été l'objet d'un très grand nombre d'études. Certains auteurs sont partis des solutions pures et ont ajouté divers ions. Nous exposerons leurs travaux, que nous avons souvent repris, en nous efforçant de les compléter sur certains points. D'autres auteurs ont étudié l'action des tissus, l'action des enzymes, enfin les actions photochimiques. Ils ont en quelque sorte envisagé le problème par son aboutissant. Décidés à suivre un développement progressif en allant du simple au complexe, nous n'avons pratiqué aucune expérience de ce type. Nous n'exposerons donc pas leurs résultats. Par contre, il

semble qu'aient été délaissées les actions de certaines molécules biologiques, les lipides, les glucides, les protides. Nous avons pratiqué un grand nombre d'expériences à leur sujet. Partant de ces quelques données, nous envisagerons donc les différents sous-chapitres suivants :

I. L'OXYDATION SPONTANÉE DE L'ACIDE ASCORBIQUE EN SOLUTION AQUEUSE

Si l'on abandonne de l'acide ascorbique en solution même acide en présence d'eau insuffisamment purifiée, on voit se produire une oxydation progressive de cet acide. Au contraire, si l'eau est parfaitement purifiée, cette oxydation, au moins du côté acide du pH, n'a pas lieu.

Nous devons rapporter ici une expérience de KELLY et ZILVA, réalisée au Lister Institute de Londres. Dans cette expérience, l'oxydation spontanée de l'acide ascorbique en solution dans l'eau de la distribution de la ville, ou dans l'eau distillée ordinaire du laboratoire, obtenue au moyen d'un appareil en cuivre étamé, est comparée à celle obtenue avec une eau redistillée d'un appareil en verre ou d'un appareil en quartz.

15 milligr. d'acide ascorbique sont dissous dans 40 cc d'eau contenus dans des flacons coniques de 100 cc. La réaction dans chaque cas est ajustée à pH 7,4 par addition de la quantité requise de soude. Le flacon est

porté à 37° pendant 20 heures. A ce moment, le pH est de 6,7. On détermine la quantité d'acide ascorbique restant au moyen d'indophénol.

Les résultats sont les suivants : partant d'environ 37 milligr. d'acide ascorbique, dans l'eau ordinaire il n'en reste pas ; dans de l'eau distillée dans du verre, il en reste 25 milligr., et dans de l'eau distillée dans du quartz, il en reste 32 mg. On voit le rôle important de la distillation dans du verre et dans du quartz. Lorsque l'eau est distillée trois fois dans un appareil en verre et utilisée immédiatement, on n'observe pas d'oxydation.

Par ailleurs, lorsque l'on fait barboter de l'oxygène dans cette eau, l'oxydation n'est pas accélérée. Ces résultats conduisent à penser que le taux de l'oxydation de l'acide ascorbique est fixé par la présence de traces de métal.

La question est reprise en 1935 par BARRON, de MEIO et KLEMPERER, de la Faculté de Médecine de l'Université de Chicago. Ils confirment le fait que, lorsque l'on prend grand soin de n'utiliser que de l'eau pure, l'oxydation de l'acide ascorbique par l'oxygène atmosphérique à 25° ne prélève en une heure qu'une quantité d'oxygène à peine mesurable avec l'appareil de Warburg, si l'on se tient à des valeurs de pH inférieures à 7.

Par contre, tous les auteurs notent une oxydation importante en milieu alcalin. C'est tout d'abord HERBERT, et ses collaborateurs de l'École de Chimie de Birmingham. Puis c'est, en 1933, KARRER, SALO-

MON, MORF et SCHÖFF. Enfin, c'est BARRON, de MEIO et KLEMPERER. Le taux de l'oxydation augmente de façon importante de pH 8 à pH 10. Dans tous ces cas, l'oxydation continue après qu'un atome d'oxygène a été employé par molécule d'acide ascorbique et se termine par la formation d'acide oxalique et d'acide thréonique.

Non seulement les cyanures de potassium (à la dose de 0,001 M par litre) n'arrêtent pas cette oxydation, mais encore ils semblent la favoriser, ainsi qu'il résulte des travaux de EULER, MYRBACK et LARSSON, d'une part, et de BARRON, de MEIO et KLEMPERER, d'autre part.

II. LE ROLE DU CUIVRE DANS L'OXYDATION DE L'ACIDE ASCORBIQUE

Diverses recherches ont été effectuées.

1° En 1922, S. HESS démontre la possibilité de détruire la vitamine C par certaines actions catalytiques dues à des métaux. Il montre en particulier que lorsque le lait est pasteurisé dans des appareils de verre, son action antiscorbutique est plus grande que lorsqu'il est traité dans des vases en cuivre.

2° En 1928, SZENT GYORGYI au moyen de l'appareil de Barcroft montre que l'acide ascorbique exerce en présence du cuivre un fort prélèvement d'oxygène.

3° En 1933, EULER, MYRBACK et LARSSON, de l'Université de Stockholm, reprennent cette question à l'aide de la technique de WARBURG.

Ils utilisent des cuves d'assez grande capacité (30 cc), cuves contenant 12 mg. d'acide ascorbique, 20 mg. d'acétate de soude, et 0 cc 05 d'une solution normale d'un sel de cuivre. Ces auteurs constatent la grande activité du cuivre.

Le tableau I résume leurs résultats.

Concentration en Cu	O ₂ en mmc.							
	6	15	35	50	80	105	165	220 min.
0	9	—	68	—	180	—	—	—
0	9	—	68	—	180	—	—	440
0,0002 mg.	9	29	65	95	177	226	353	438
0,002	87	182	328	402	551	595	685	698
0,01	158	320	522	600	706	725	725	—
1	303	515	524	524	—	—	524	524

4° En 1935, KELLY et ZILVA étudient cette action catalytique du cuivre, en suivant au moyen de l'indophénol la disparition de l'acide ascorbique. Le tableau suivant résume leurs résultats :

Mg d'acide ascorbique par 100 cc d'eau.

Heures	Eau distillée dans le quartz	Eau distillée dans le quartz + 0,01 mg. de Fe 40 cc	Eau distillée dans le quartz + 0,01 mg. de Cu 40 cc
0	37,0	34,5	34,1
1	35,2	31,8	24,2
2	33,0	29,6	21,2
3	30,9	28,2	15,2
4	29,4	25,8	8,0
20	25,7	10,3	0,0

5° BARRON, de MEIO et KLEMPERER, en 1935, ont repris cette étude. L'oxydation de l'acide ascorbique, en dessous de pH 6,6, avec du cuivre comme catalyseur (0,0002 mM de Cu Cl_2) demande 1 atome d'oxygène par molécule d'acide ascorbique. Ce résultat reste valide de pH 4,17 à pH 6,6.

L'effet catalytique du cuivre peut être observé avec des quantités extrêmement minimales, telles que 46 microgrammes par litre (0,000727 mM de Cu Cl_2 par litre). Le pouvoir catalytique extraordinaire du cuivre explique sans doute, par la présence de traces de cuivre, ce que l'on a appelé l'autoxibilité de l'acide ascorbique. Avec une augmentation de 1/10 dans la concentration en cuivre, l'oxydation de l'acide ascorbique augmente aussi de 1/10. Avec une augmen-

tation de $1/100$ l'oxydation augmente de $1/35$. Avec une augmentation de $1/1.000$, l'oxydation augmente de $1/174$. L'oxydation est d'autant plus rapide que le pH est plus élevé.

A l'appareil de Warburg, si l'on diminue la concentration d'oxygène de 21 %, tel qu'il est dans l'air, à 5 % par addition d'azote, on déclenche une inhibition de 56 % dans le taux de l'oxydation de l'acide ascorbique catalysé par le cuivre.

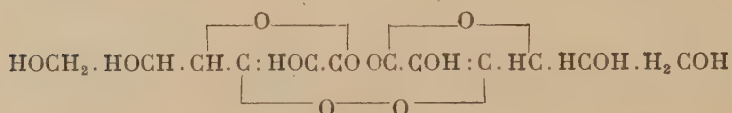
Les variations de la température ne semblent avoir qu'une faible action lorsque l'on se tient entre 30 et 40°.

6° En 1938, BEZSSONOFF et Mme WOLOSZYN reprennent ces mêmes expériences.

Ne possédant pas d'appareil de Warburg, ces auteurs se contentent de fioles en pyrex reliées à un tube en U destiné à servir de manomètre. Le volume de la fiole est d'environ 73 cc. Ces fioles contiennent une solution d'acide ascorbique en présence de cuivre. Avec une série de précautions, les fioles sont maintenues à l'étuve à 37° pendant 48 ou 75 heures et on observe des déviations manométriques.

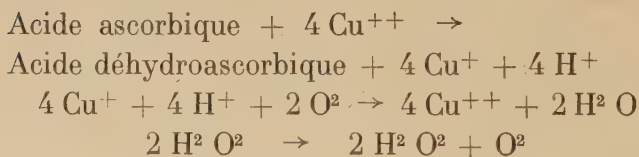
Les auteurs croient découvrir par leurs calculs, sur l'oxygène absorbé, la présence d'une forme demi-oxydée correspondant à l'absorption d'un atome d'oxygène pour deux molécules d'acide ascorbique. Cette dépense d'oxygène est indépendante des variations de la pression d'oxygène réalisée à l'intérieur des vases clos. Pour expliquer ce fait, les auteurs font

l'hypothèse de l'existence soit d'un composé complexe (acide ascorbique + acide déhydroascorbique), soit d'un corps ayant la structure d'un éther ascorbique, qu'ils figurent comme suit :



Les formules chimiques qui traduisent l'intervention du cuivre ont été données par BARRON, de MEIO et KLEMPERER.

Ils écrivent :



Cette action du cuivre est inhibée par un certain nombre de corps :

1° Le glutathion : SZENT GYÖRGYI, dès 1928, indique que si de l'acide ascorbique oxydé est porté à pH 7, avec du glutathion réduit, le glutathion est oxydé, l'acide est réduit. Ce résultat est obtenu par le dosage du glutathion avec le nitroprussiate et de l'acide ascorbique par l'iode. La question est reprise en 1936 par Mac FARLANE qui conclut aussi à une

inhibition. Mac FARLANE suivait l'oxydation de l'acide ascorbique d'un jus d'orange au moyen du dosage par le 2,6-dibromophénol-indophénol.

HOPKINS et MORGAN reprennent la question en titrant le glutathion au moyen de l'iode et l'acide ascorbique par la méthode de TILLMAN. Ils concluent à une inhibition totale de l'acide ascorbique par le glutathion, lorsque cette oxydation est poursuivie en utilisant le cuivre comme catalyseur.

Les auteurs pensent que le glutathion réduit et le cuivre font un composé stable qui fait disparaître, bien entendu, toutes les propriétés du cuivre.

En 1937, BORSOOK, DAVENPORT et WARNER notent que si les quantités de glutathion employées sont suffisantes, la réduction de l'acide déhydroascorbique est très rapide, même à l'air. Leurs expériences sont réalisées par des titrations au moyen du 2,6-dichlorophénol-indophénol.

2° L'inhibition de l'oxydation catalytique peut encore se faire par l'hydrogène sulfuré qui réduit l'acide déhydroascorbique et arrête l'oxydation de l'acide ascorbique en présence du cuivre. Cette action de l'hydrogène sulfuré, décelée dès 1928 par SZENT GYÖRGYI, est encore rapportée par BARRON, de MEIO et KLEMPERER en 1935.

Mac FARLANE signale en outre l'action inhibitrice de la cystine, de la cystéine et du diéthylthiocarbamate. Enfin, LEYMAN, SCHULTZE et KING signalent l'action inhibitrice de l'acide métaphosphorique, constatée au moyen de l'appareil de Warburg.

BORSOOK, DAVENPORT, JEFFREYS et WARNER étudient l'action de 29 substances au point de vue de leur possibilité de réduction de l'acide déhydroascorbique. Ils examinent ainsi : *dl*-alanine, *l*-asparagine, acide *l*-aspartique, *l*-cystéine, formiate de lithium, fructose, fumarate de soude, glycérophosphate de soude, galactose, glucose, acide *d*-glutamique, glycine, hexosediphosphate de calcium, *l*-histidine, *l*(+)-lactate de soude, *l*-leucine, *d*-lysine, *l*-malate de soude, maléate de soude, *dl*-méthionine, *d*-ornithine, *dl*-phényl-alanine, *l*-proline, pyruvate de lithium, *dl*-serine, succinate de soude, *l*-tryptophane, *l*-tyrosine et *d*-valine. L'expérience est réalisée à 37°5 et à pH 7. Seule la cystéine est active. En 60 minutes cependant on trouva une réduction équivalente à 3 % avec le pyruvate de lithium, à 2 % avec l'hexosediphosphate de calcium, et à 1 % avec le malate de sodium.

Nous avons repris cette étude.

Nos résultats personnels sont exprimés dans les tableaux 1, 2 et 3.

TABLEAU N° 1

Oxydation de l'acide ascorbique en présence de SO^4Cu et de glutathion
(l'acide ascorbique est utilisé peu après sa dissolution). Milieu non tamponné.

N° de l'expérience	N° de la cuve	Solution d'acide ascorbique		Solution SO^4Cu		Solution glutathion		pH	Durée expérience exprimée en heures	O_2 absorbé exprimé en mm^3	Variation %
		Concentration ‰	Nombre de cc utilisés	Concentration ‰	Nombre de cc utilisés	Concentration ‰	Nombre de cc utilisés				
1	1	0,6	1					2,6	1	12,6	157
	2	0,6	1	0,05	0,5			2,6	1	32,4	
	3	0,6	1	0,05	0,5	0,05	0,2	2,6	1	0	
	4	0,6	1	0,05	0,5	0,05	0,4	2,6	1	0	
2	1	0,6	1					2,6	2	36,52	201
	2	0,6	1	0,05	0,5			2,6	2	110,18	
	3	0,6	1	0,05	0,5	0,05	0,2	2,6	2	1,57	
	4	0,6	1	0,05	0,5	0,05	0,4	2,6	2	0	
3	1	0,6	1					2,6	1	19,92	117
	2	0,6	1	0,05	0,5			2,6	1	43,26	
	3	0,6	1	0,05	0,5	0,05	0,2	2,6	1	0	
	4	0,6	1	0,05	0,5	0,05	0,4	2,6	1	0	
4	1	0,6	1					2,6	2	61,42	67
	2	0,6	1	0,05	0,5			2,6	2	103	
	3	0,6	1	0,05	0,5	0,05	0,2	2,6	2	14,58	
	4	0,6	1	0,05	0,5	0,05	0,4	2,6	2	10,99	

* Cette expérience a été faite avec de la Laroscorbine Hoffmann-Laroche.

TABLEAU N° 2

Oxydation de l'acide ascorbique en présence de SO^+Cu (acide ascorbique, utilisé peu après sa dissolution et tamponné à $\text{pH}=6,8$ avec des solutions de phosphates disodique et monopotassique.)

N° de l'expérience	Solution d'acide ascorbique		Solution SO ⁺ Cu		Solution glutathion		Durée de l'expérience exprimée en heures	O ² absorbé exprimé en mm ³	Variation %	
	Concentration ‰	Nombre de cc utilisés	Concentration ‰	Nombre de cc utilisés	Concentration ‰	Nombre de cc utilisés				
1	1	0,6	1	0,05	0,1			1	18,70	121
	2	0,6	1					1	41,50	
	1	0,6	1	0,05	0,1			1	19,56	137
	2	0,6	1					1	46,39	
3	1	0,6	1	0,05	0,1	0,05	0,2 ⁺ 0,4	2	33,2	148
	2	0,6	1					2	82,4	
	3	0,6	1					2	0	
	4	0,6	1					2	0	
4	1	0,6	1	0,05	0,1			2	36,52	63
	2	0,6	1					2	59,74	
5	1	0,6	1	0,05	0,1			2	37,49	133
	2	0,6	1					2	87,40	
6	1	0,6	1	0,05	0,1			1	21,58	106
	2	0,6	1					1	44,52	
7	1	0,6	1	0,05	0,1			1	23,10	106
	2	0,6	1					1	47,60	

TABLEAU N° 3

Oxydation de l'acide ascorbique en présence de SO^+Cu et de glutathion. Acide ascorbique étant utilisé après réalisation d'un équilibre. Milieu non tamponné.

N° de l'expérience	N° de la cuve	Solution d'acide ascorbique	Solution SO^+Cu	Solution glutathion	pH	Durée expérience exprimée en heures	O_2 absorbé exprimé en mm ²
		Concentration ‰	Nombre de cc utilisés	Concentration ‰	Nombre de cc utilisés		
1	1	0,6	1			2,6	0
	2	0,6	1	0,05	0,5	2,6	20,06
	3	0,6	1	0,05	0,5	2,6	0
	4	0,6	1	0,05	0,5	2,6	0
				0,05	0,2		
				0,05	0,4		

De l'examen de ces divers tableaux, on peut conclure :

1° Lorsqu'une solution d'acide ascorbique est placée à pH 2,6 en solution non tamponnée, dans de l'eau distillée simplement avec des appareils en verre pyrex, elle subit une légère oxydation spontanée, due sans doute à des traces de cuivre contenues dans l'eau en dissolution.

Si l'on ajoute de petites quantités de cuivre, sous forme de sulfate de cuivre, l'oxydation est augmentée constamment.

Dans nos expériences, le taux de l'augmentation est assez variable. Nous pensons pouvoir attribuer

ces variations aux temps très différents les uns des autres qui se sont écoulés entre le moment de la dissolution de l'acide ascorbique dans l'eau et le moment de l'expérience. Dans cette expérience, on a eu soin, bien entendu, de placer dans la cuve du témoin une quantité d'eau distillée égale en volume à la quantité de solution de sulfate de cuivre ajoutée dans la cuve en expérience.

Ainsi, lorsqu'on ajoute du cuivre à une solution d'acide ascorbique récente, celle-ci s'oxyde avec une grande intensité. Ces résultats sont conformes à ceux des auteurs que nous avons déjà cités.

1^o Lorsqu'on pratique la même recherche dans des solutions d'acide ascorbique tamponnées à pH 6,6 par des phosphates, les résultats sont les mêmes et du même ordre de grandeur.

3^o Dans le cas des solutions non tamponnées comme dans le cas des solutions tamponnées, le glutathion, ajouté sous forme de poudre, à ces solutions, puis dissous dans ces solutions, provoque un arrêt à peu près complet de ces oxydations de l'acide ascorbique.

4^o Si l'on fait tourner pendant 24 heures au moins la solution d'acide ascorbique dans un tonomètre chargé en oxygène, un équilibre s'établit. Si l'on ajoute alors une solution de sulfate de cuivre on obtient une nouvelle oxydation de l'acide ascorbique. Dans ce cas encore, le glutathion arrête cette oxydation.

III. LE ROLE DU FER ET D'UN CERTAIN NOMBRE D'AUTRES MÉTAUX DANS L'OXYDATION DE L'ACIDE ASCORBIQUE

SZENT GYÖRGYI, en même temps qu'il signale l'action du cuivre sur l'oxydation de l'acide ascorbique, discute l'action d'un certain nombre d'autres métaux, étudiés toujours avec l'appareil de Barcroft. Le fer agit peu ou pas, écrit-il ; le manganèse n'augmente pas l'absorption.

KELLY et ZILVA, par contre, trouvent une action du fer, action nette, mais inférieure à celle du cuivre. Leurs résultats sont exprimés dans le tableau que nous avons déjà donné.

EULER, MYRBACK et LARSSON publient le tableau suivant :

	Concentration O ₂ en mmc en Fer			
	15	30	45	165 min.
0	52	98	139	390
0,00064 mg. ..	36	56	79	317
0,0064	90	158	214	545
0,064	108	202	273	620
0,64	242	424	505	603

D'après ces auteurs, le fer aurait donc une action catalytique. En outre, ces mêmes auteurs retrouvent une légère action activante au manganèse, au nickel

et au calcium. Par contre, le cobalt aurait une action inhibitrice.

BARRON, de MEIO et KLEMPERER poursuivent un grand nombre d'expériences à pH 4,15 et à pH 6,28, avec les différents sels suivants : sulfate de manganèse, chlorure de nickel, sulfate de cobalt, chlorure ferrique, sulfate ferreux ammoniacal, chlorure de calcium. Ces sels sont employés à la concentration de 0,004 mM à 0,01 mM. L'acide ascorbique est employé à la concentration de 0,02 mM ; en aucun cas, l'oxydation de l'acide ascorbique n'est catalysée.

Personnellement, nous apportons les résultats suivants :

TABLEAU N° 4

Oxydation de l'acide ascorbique en présence de SO^+Fe^3 , et de glutathion —(acide ascorbique utilisé au moment de sa dissolution et non tamponné —pH = 2,6).

N° de l'expérience	Solution d'acide ascorbique		Solution $(\text{SO}^+)\text{Fe}^3$		Solution glutathion		Durée expérience exprimée en heures	O^2 absorbé en mm ²	Variation %
	N° de la cuve	Concentration ‰	Nombre de cc utilisés	Concentration ‰	Nombre de cc utilisés	Concentration ‰	Nombre de cc utilisés		
1	1	1,2	1					1	14,78
	2	1,2	1	0,05	0,5			1	13,46
	3	1,2	1	0,05	0,5	0,05	0,2	1	0
	4	1,2	1	0,05	0,5	0,05	0,4	1	0
2	1	1,2	1					2	24,90
	2	1,2	1	0,05	0,5			2	24,72
	3	1,2	1	0,05	0,5	0,05	0,2	2	0
	4	1,2	1	0,05	0,5	0,05	0,4	2	0

TABLEAU N° 5

Oxydation de l'acide ascorbique en présence de sulfate ferrique et glutathion, en milieu non tamponné à pH = 2,6 (acide ascorbique utilisé au moment de sa dissolution).

N° de l'expérience	N° de la cuve	Solution d'acide ascorbique		Solution (SO ⁴) ₂ Fe ³		Solution glutathion		Durée expérience exprimée en heures	O ² absorbé exprimé en mm ³	Variation %
		Concentration ‰	Nombre de cc utilisés	Concentration ‰	Nombre de cc utilisés	Concentration ‰	Nombre de cc utilisés			
1	1	0,6	1					2	56,44	86
	2	0,6	1	0,05	0,5			2	105,06	
	3	0,6	1	0,05	0,5	0,05	0,2	2	0	
	4	0,6	1	0,05	0,5	0,05	0,4	2	0	
2	1	0,6	1					2	59,76	68
	2	0,6	1	0,05	0,5			2	100,94	
	3	0,6	1	0,05	0,5	0,05	0,2	2	6,28	
	4	0,6	1	0,05	0,5	0,05	0,4	2	8,10	

On voit que, à pH 2,6, le fer à l'état ferreux n'a provoqué aucune oxydation de l'acide ascorbique. Par contre, à l'état ferrique et à pH 2,6, en milieu non tamponné, nous avons eu une augmentation de l'oxydation. Nos résultats se rapprocheraient donc par là de ceux de KELLY et ZILVA et de ceux de EULER.

Là encore, le glutathion annule les oxydations.

IV. LE ROLE DES GLUCIDES DANS L'OXYDATION DE L'ACIDE ASCORBIQUE

Les glucides, si l'on fait exception du fructose et de la dioxyacétone, ne sont pas autoxydables.

Cependant, des corps qui en dérivent et qui sont encore mal connus, sont au contraire nettement autoxydables. Parmi eux, il faut distinguer :

1° Le glucose évolué. SCHOU et WURMSER, en 1928, ont désigné sous le nom de forme active du glucose, un corps inconnu qui provient du glucose et dont ils donnent le spectre de rayons ultra-violet. En 1930, CLIFTON et ORT le désignent sous le même nom. WURMSER et GELOSO, pour éviter toute confusion, avec le glucose γ souvent désigné lui aussi sous le nom de glucose actif, l'appellent glucide évolué. En 1934, MAYER-REICH décrit ainsi sa technique de préparation : « Les solutions actives sont préparées en laissant évoluer dans le vide (en tube scellé) pendant 30 minutes à 100°, une solution de glucose à 3 % dans de la soude N/10. »

a) L'auteur suit l'autoxydation de ce corps au moyen de l'appareil de Warburg.

Il étudie la fixation d'oxygène par une solution à 3 % de glucose, préparée à partir d'une solution à 30 % de glucose évolué dans la soude N/10 ; dans le vide, à 100° (bain-marie bouillant) pendant 30 minutes, et diluée dix fois dans une solution-tampon de phosphate

M. Après dilution, le pH de la solution est le même que le pH du tampon, la solution de glucide introduite étant en petite quantité et mal tamponnée.

Il introduit dans les récipients 2 cc de cette solution et 0 cc 2 de potasse à 30 % dans l'ampoule latérale.

La vitesse de fixation de l'oxygène diminue avec le temps. La tension de l'oxygène influe peu sur la vitesse de fixation de ce gaz.

La vitesse de fixation de l'oxygène est augmentée par la diminution de l'activité des ions hydrogène.

Cette oxydation s'accompagne d'un dégagement de CO_2 .

b) La forme oxydée des corps oxydoréducteurs formés dans les solutions évoluées de glucides n'est pas stable. Au cours des titrages électrométriques, l'auteur observe que le palier de la courbe représentant le potentiel en fonction des quantités d'oxydant ajoutées à la solution, est plus étendu que le palier de la courbe obtenue par titrage en retour avec un réducteur. La mesure du gaz carbonique produit au cours de cette oxydation montre que cette différence est due à l'instabilité de la forme oxydée. L'oxydation réversible de la forme réduite apparue au cours de l'évolution des solutions de glucides est donc prolongée par une phase irréversible, caractérisée par une décarboxylation plus ou moins profonde ou plus ou moins rapide suivant la nature de l'oxydant employé.

c) L'auteur trouve un nouvel argument en faveur de la réversibilité, en titrant électrométriquement une

solution de glucide évolué, au moyen de deux oxydants très différents : du ferricyanure de potassium et du bleu de méthylène vis-à-vis desquels la forme oxydée est très inégalement instable. Les niveaux des potentiels correspondant aux paliers des courbes de titrage coïncident entre eux et caractérisent donc bien le système oxydoréducteur dérivé des glucides et non pas l'agent de titrage.

2° La redoxine doit être rapprochée de ces corps. WURMSER l'a décrite en ces termes : « Quand on plonge une électrode inerte dans une solution d'un glucide réducteur maintenue à l'abri de l'oxygène, on observe que son potentiel s'abaisse de plus en plus et atteint une valeur-limite au bout d'un temps d'évolution qui diminue avec l'alcalinité et la température et qui varie de quelques minutes à quelques mois. Si l'on tient compte des modifications de l'activité en ions H^+ qui se produisent dans les solutions, tous les glucides ont, dans la limite de précision des expériences, le même potentiel-limite, soit $E_H = -0,168$ volt à pH 7, à 20°. Les indicateurs dont le potentiel normal d'oxydoréduction est plus élevé que cette valeur-limite sont tous décolorés par les solutions de glucides évoluées. Mais si l'on note les vitesses de réduction des divers colorants, on constate qu'ils sont réduits jusqu'à la phénosafranine non comprise avec des vitesses très inégales. Il existe une discontinuité très nette au niveau du bleu de méthylène. Les colorants de potentiels plus élevés, et le bleu de méthylène lui-même sont réduits presque instantanément ;

ceux de potentiels immédiatement inférieurs, comme les sulfonates d'indigo ne le sont plus qu'avec une extrême lenteur. Cette discontinuité est située à un niveau assez éloigné du potentiel d'équilibre pour qu'on ne puisse pas attribuer au voisinage de cet équilibre le ralentissement de la réduction. D'autre part, il ne semble pas que la discontinuité soit due à la nature chimique des colorants à base d'indigo, puisqu'elle se reproduit lorsque l'oxydant est du ferricyanure de potassium, comme le montre un titrage électrométrique rapide au moyen de ce corps. Tout se passe comme s'il existait dans les solutions de glucides évoluées, en plus du système lent responsable du potentiel-limite, un deuxième système réversible, très mobile. Le point d'inflexion de la courbe de titrage électrométrique de ce deuxième système correspond à : $E_0' = + 0,03$ volt à pH 7 et 20°.

Ce système auquel WURMSER propose de donner le nom de rédoxine, peut être mis en évidence autrement. Il est caractérisé par son spectre d'absorption ultra-violet qui présente une bande située à 2.780 Å° en solution à pH 7, et à 2.650 Å° en solution à pH 1. Il se distingue ainsi de la réductone de von EULER et de l'acide ascorbique de SZENT GYORGYI.

3° La réductone de von EULER et MARTIUS. La réductone est préparée suivant la technique indiquée par von EULER et MARTIUS, en chauffant une solution alcaline de glucose en présence l'acétate de plomb. Le sel de plomb lavé, séché, puis mis en suspension

dans de l'acétone, est décomposé par d'acide sulfhydrique. La réductone se sépare à l'état de cristaux. D'après von EULER et MARTIUS, le corps a la constitution de la forme énolique de l'aldéhyde tartronique : $\text{OH.CH : C (OH).CHO}$.

La réductone réduit l'iode à la température ordinaire et en milieu acide, à raison de 2 atomes d'iode par molécule. Le produit d'oxydation probable est le propanonedial : OHC.CO.CHO , ou plutôt son hydrate $\text{OHC.C (OH)}_2\text{.CHO}$.

Le potentiel normal à pH 0 du système réductone oxyréductone est à 38° de + 0,282 volts.

La mobilité de ces corps dérivés des glucides nous a engagé à rechercher l'action des glucides en milieu acide sur l'oxydation de l'acide ascorbique. Les résultats que nous avons obtenus sont exprimés dans le tableau 6.

TABLEAU N° 6

Oxydation de l'acide ascorbique en présence de différents sucres (glucose, galactose, lactose, mannose et dextrine), en solution dans cet acide. L'acide ascorbique étant auparavant équilibré.

N° de l'expérience	N° de la cuve		Solution d'acide ascorbique	Sucres exprimés en cg.					Eau : nombre de cc utilisés.	Tampon	pH	Durée de l'expérience exprimée en heures	O ² dégagé en mm ³	Δ°
		Concentration N° de cc utilisés		Glucose	Galactose	Lactose	Mannose	Dextrine						
1	1	2	1	3					1	0	5,6	2	0	0
	2	2	1	3					0	0	5,6	2	0	
	3	2	1	3					0	0	5,6	2	0	
2	1	2	1		3					0	4,9	1	3,32	3,36
	2	2	1		3					0	4,9	1	3,40	
	3	2	1		3				1	0	4,9	1	0	
3	1	2	1		3				1	0	4,9	2	6,64	6,64
	2	2	1		3				1	0	4,9	2	0	
	3	2	1		3					0	2,6	2	0	
4	1	2	1			3				0	5,4	2	0	0
	2	2	1			3			1	0	5,4	2	0	
	3	2	1							0	5,6	2	0	
5	1	2	1				3			0	5,8	2	3,92	3,33
	2	2	1				3			0	5,8	2	4,99	
	3	2	1				3		1	0	5,8	2	1,66	
6	1	2	1					3		0	2,6	2	0	
	2	2	1					3		Citrate et NaOH	6,2	2	4,98	4,90
	3	2	1					3	1		6,2	2	4,86	
	4	2	1								6,2	2	0	

On désigne par Δ° la différence O² absorbée en mm³ par le sucre + acide ascorbique et par le sucre seul.

On voit que :

1° Les glucides étudiés : glucose, galactose, lactose, mannose, et dextrine, ne s'autoxydent partiquement pas dans l'appareil de Warburg.

2° Lorsque l'on ajoute ces solutions de glucides à des solutions équilibrées d'acide ascorbique, c'est-à-dire à des solutions d'acide ascorbique partiellement oxydées et n'absorbant plus d'oxygène, aucune absorption nouvelle d'oxygène n'est réalisée. Les glucides observés sont donc sans action sur l'oxydation de l'acide ascorbique.

V. LE RÔLE DES PROTÉINES DANS L'OXYDATION DE L'ACIDE ASCORBIQUE

Ainsi que nous l'avons précédemment annoncé, nous laisserons de côté dans ce chapitre toutes les recherches réalisées avec des tissus ou même avec des protéines. Nos investigations personnelles n'ont pas porté au delà des peptones. Elles s'intéressent uniquement à ces corps et aux acides aminés. Les corps plus élevés dans la classification chimique, tels que les protéines, seront étudiés dans un autre travail réalisé dans le même laboratoire.

PARROD, en 1938, a noté que si l'on traite de l'acide ascorbique en solution dans l'eau par de l'ammoniaque, après 1 heure apparaissent de fines aiguilles dont la quantité croît peu à peu pendant 48 heures. Ces aiguilles sont constituées par de l'oxamide. Dans les mêmes conditions, l'hydrazine donne la dihydrazide oxalique; la méthylamine, la diméthylamine ne donnent aucun cristal, l'éthylamine donne le diéthyl-oxamide, la butylamine donne la dibutyloxamide, l'isoamylamine donne la di-isoamyl-oxamide, et la cyclohexylamine donne la dicyclohexyl-oxamide.

De même, si l'on prend de l'acide déhydroascorbique et qu'on le traite par l'ammoniaque, puis par de l'eau oxygénée, on obtient de l'oxamide.

Nous avons repris la première de ces expériences qui s'est réalisée conformément aux descriptions de l'auteur. Une addition de glutathion a très nettement

diminué la quantité d'oxamide formée, mais nous n'avons pas procédé à un dosage.

Von EULER, KARRER et ZEHENDER rapportent que l'acide déhydroascorbique peut oxyder la leucine, donnant naissance à de l'ammoniaque et à des substances réductrices. BORSOOK, DAVENPORT, JEFFREYS et WARNER, par contre, montrent que les acides aminés, excepté la cystéine, ne sont pas capables de réduire l'acide déhydroascorbique. Ce qui semble bien indiquer que seul le groupe S H peut être actif dans ce sens.

Nous avons repris cette étude et nous exprimons nos résultats dans le tableau 7.

par les peptones, dans l'oxydation de l'acide ascorbique.

Nous avons d'abord ajouté des solutions de peptones aux solutions d'acide ascorbique, puis pensant qu'introduisant de l'eau, nous introduisions aussi des traces de cuivre, pour éviter cette cause d'erreur, nous avons dissous directement la peptone dans la solution d'acide ascorbique. Dans tous les cas, une quantité semblable de peptone était minéralisée dans une capsule de platine ; le produit de la minéralisation était repris par 1 cc d'une solution de N/50 d'acide chlorhydrique. Le liquide ainsi obtenu était porté dans une cuve de Warburg, avec une quantité équivalente à celle du témoin d'acide ascorbique. L'oxydation était mesurée au moyen de l'appareil de Warburg ; le rôle des impuretés métalliques des peptones était ainsi exactement mesuré.

Nos résultats sont les suivants :

TABLEAU N° 8

Oxydation de l'acide ascorbique, en présence de peptone de rale, en solution dans cet acide. (Acide ascorbique, utilisé, au moment de sa dissolution : N Sørensen de la solution à 3 % de cette peptone est de 0,49 ‰. Solution non tamponnée.)

N° de l'expérience	N° de la cuve	Solution d'acide ascorbique		Peptone de rale exprimé en cg.	pH	Durée expérience exprimée en heures	O absorbé exprimé en mm ²	Variation %
		Concentration ‰	Nombre de cc utilisés					
1	1	2	1	3	2,8	1 ½	23,25	—187
	2	2	1		4	1 ½	8,08	
2	1	2	1	3	2,8	1 ½	21,06	—166
	2	2	1		4	1 ½	7,90	
3	1	2	2	6	2,8	2	34,76	—149
	2	2	2		4	2	13,95	
4	1	2	2	6	2,8	2	32,32	—149
	2	2	2		4	2	12,96	
5	1	2	2	6	2,8	2	33,18	—108
	2	2	2		4	2	15,92	
6	1	2	2	6	2,8	2	36,36	—95
	2	2	2		4	2	18,60	
7	1	2	2	6	2,8	2	29,4	—97
	2	2	2		4	2	14,9	
8	1	2	2	6	2,8	2	28,9	—77
	2	2	2		4	2	16,3	

Le produit de la minéralisation a peu d'action (3,32) sur l'acide ascorbique équilibré. La solution de peptone ne donne pas les réactions du cuivre.

TABLEAU N° 9

Oxydation de l'acide ascorbique en présence de différentes peptones (raie, écrevisse, perche, jaune d'œuf) en solution dans cet acide. L'acide ascorbique étant auparavant entièrement équilibré.

N Sørensen respectifs de ces différentes solutions de peptones à 3 g. % sont :

Raie	0,49 %
Écrevisse	0,84 %
Perche	0,52 %
Jaune d'œuf	0,62 %

N° de l'expérience	N° de la cuve	Solution d'acide ascorbique		Peptones exprimées en cg.				Eau : nombre de cc utilisés	pH	Durée de l'expérience exprimée en heures	O ² absorbé exprimé en mm ³	Δ O ²
		Concentration %/100	Nombre de cc utilisés	Raie	Écrevisse	Perche	Jaune d'œuf					
1	1 2 3	2 2 2	1 1 1	3 3				1	4,4 4,4 2,6	1 1/4 1 1/4 1 1/4	21 38,18 0	17,18
2	1 2 3	2 2 2	1 1 1		3 3			1	4,6 4,6 2,6	1 1 1	8,45 19,92 0	11,47
3	1 2 3	2 2 2	1 1 1			3 3		1	5 5 2,6	2 2 2	0 29,8 0	29,8
4	1 2 3	2 2 2	1 1 1			3 3		1	5 5 2,6	2 2 2	0 32,2 0	32,2
5	1 2 3	2 2 2	1 1 1				3 3	1	4,4 4,4 2,6	2 2 2	15 36,52 0	21,52

TABLEAU N° 10

Oxydation de l'acide ascorbique, en présence de différentes peptones (raie et écrevisse) en solution dans cet acide à la concentration de 3 %. L'acide ascorbique étant auparavant entièrement équilibré, et tamponné avec des solutions de phosphates disodique et monopotassique N Sørensen de la solution à 3 % de ces peptones sont :

Raie : 0,49 ‰.
 Ecrevisse 0,84 ‰.

N° de l'expérience	N° de la cuve		Solution d'acide ascorbique		Peptones exprimés en cg.		Eau : nombre de cc utilisés	pH	Durée de l'expérience exprimée en heures	O ² absorbé exprimé en mm ³	Δ O ²	O ² absorbé après minéralisation
			Concentration ‰	Nombre de cc utilisés								
	Raie	Écrevisse										
1	1	3	2	1	3		1	4,8	1	10,9	12,34	3,32
	2	3	2	1	3			4,8	1	23,24		
	3	3	2	1	3			4,8	1	0		
2	1	3	2	1	3		1	4,8	1	10,9	14,6	3,32
	2	3	2	1	3			4,8	1	25,5		
	3	3	2	1	3			4,8	1	0		
3	1	3	2	1	3	3	1	6,8	2	6,64	19,92	0
	2	3	2	1	3	3		6,8	2	26,56		
	3	3	2	1	3	3			2	0		
4	1	3	2	1	3		1	6,8	2	6,64	23,66	0
	2	3	2	1	3			6,8	2	30,30		
	3	3	2	1	3				2	0		

TABLEAU N° 11

Oxydation de l'acide ascorbique en présence de différentes peptones (raie, écrevisse, gélatine, caséine) en solution dans cet acide. L'acide ascorbique étant auparavant équilibré et tamponné avec solution citrate de Na et NaOH.

N Sørensen respectifs de ces solutions de peptones à 3% sont :

Raie	0,49‰
Écrevisse	0,84‰
Gélatine	0,53‰
Caséine	0,58‰

N° de l'expérience	N° de la cuve	Solution d'acide ascorbique		Peptones exprimées en cg.				Eau : nombre de cc utilisés	pH	Durée de l'expérience exprimée en heures	O ² absorbé exprimé en mm ³ .	ΔO ²
		Concentration ‰	Nombre de cc utilisés	Raie	Écrevisse	Gélatine	Caséine					
1	1	2	1	3				1	4,8	2	12,60	18,94
	2	2	1	3					4,8	2	31,54	
	3	2	1	3					4,8	2	0	
2	1	2	1	3				1	4,8	2	11,90	19,07
	2	2	1	3					4,8	2	30,97	
	3	2	1	3					4,8	2	0	
3	1	2	1		3			1	4,8	1 1/2	8,45	28,07
	2	2	1		3				4,8	1 1/2	36,52	
	3	2	1		3				4,8	1 1/2	0	
4	1	2	1		3			1	4,8	1 1/2	9,62	25,42
	2	2	1		3				4,8	1 1/2	35,04	
	3	2	1		3				4,8	1 1/2	0	
5	1	2	1			3		1	6,2	1	4	20,9
	2	2	1			3			6,2	1	24,90	
	3	2	1			3			6,2	1	0	
6	1	2	1			3		1	6,2	1	4	17
	2	2	1			3			6,2	1	21	
	3	2	1			3			6,2	1	0	
7	1	2	1			3		1	6,2	1	6	23
	2	2	1			3			6,2	1	29,40	
	3	2	1			3			6,2	1	0	
8	1	2	1			3		1	6,2	1	6	25,54
	2	2	1			3			6,2	1	31,54	
	3	2	1			3			6,2	1	0	
9	1	2	1				3	1	6,2	1	0	14,9
	2	2	1				3		6,2	1	14,94	
	3	2	1				3		6,2	1	0	

* On désigne par ΔO² la différence, O² absorbé en mm³, par la peptone additionnée d'acide ascorbique et la peptone seule.

lui ajoute en solution tamponnée, soit, par des citrates soit par des phosphates, des peptones diverses (raie, écrevisse, perche, jaune d'œuf), on obtient une augmentation de l'oxygène absorbé.

3° L'addition de glutathion dans le cas de la peptone de perche diminue l'oxygène absorbé.

4° Les solutions de peptones en milieu tamponné à des pH acides, paraissent s'autoxyder légèrement mais constamment, lorsqu'elles sont agitées dans les cuves de l'appareil de Warburg.

L'interprétation de ces résultats est plus difficile.

Le fait brutal d'absorption d'oxygène du mélange peptone et acide ascorbique peut être dû à l'oxydation de l'un des deux ou des deux à la fois.

Le fait que les peptones agissent de deux façons opposées sur l'absorption d'oxygène selon qu'on les ajoute à de l'acide ascorbique équilibré ou non tient peut-être à ce que les oxydations de l'acide ascorbique, en solution représentant le premier palier réversif, les oxydations de l'acide ascorbique équilibré représenteront le deuxième palier, l'évolution vers une scission de l'acide déshydroascorbique formé.

Ces hypothèses sont à vérifier.

VI. ROLE DES LIPIDES DANS L'OXYDATION DE L'ACIDE ASCORBIQUE

Le milieu hétérogène constitué par les lipides ne nous a pas donné assez de sécurité pour que nous osions l'étudier avec l'appareil de Warburg. Par contre, nous avons fait une expérience destinée à déterminer l'action de l'acide ascorbique sur les liaisons éthyléniques des lipides et de l'huile de foie de morue.

Nous avons étudié l'indice d'iode d'une émulsion peu stable d'acide oléique et d'huile de foie de morue dans l'eau après addition d'acide ascorbique. Nous avons refait le même indice d'iode pour les mêmes lipides des mêmes solutions après 40 jours de contact. Nous avons obtenu les résultats suivants :

VARIATION DE L'INDICE D'IODE DE CERTAINS LIPIDES EN PRÉSENCE D'ACIDE ASCORBIQUE.		
1 ^{er} Jour		Indice d'Iode
Flacon n° 1	{ 1 cc d'acide oléique 5 cc d'eau }	37,45
Flacon n° 2	{ 1 cc d'acide oléique 4 cc d'acide ascorbique à 2 ‰ ... }	36,98
Flacon n° 3	{ ½ cc d'huile de foie de morue ... 4 cc ½ d'eau }	34,34
Flacon n° 4	{ ½ cc d'huile de foie de morue ... 4 cc ½ d'acide ascorbique à 2 ‰ ... }	31,65
40 ^e Jour		Indice d'Iode
Flacon n° 1	{ 1 cc d'acide oléique 5 cc d'eau }	33,65
Flacon n° 2	{ 1 cc d'acide oléique 4 cc d'acide ascorbique à 2 ‰ ... }	34,10
Flacon n° 3	{ ½ cc d'huile de foie de morue ... 4 cc ½ d'eau }	29,33
Flacon n° 4	{ ½ cc d'huile de foie de morue ... 4 cc ½ d'acide ascorbique à 2 ‰ ... }	27,90

On voit d'après ce tableau que les actions sont extrêmement minimales, de sens variables, et nous croyons pouvoir tenir cette expérience pour négative.

CHAPITRE III

Oxydation de complexes acide dicétogulonique - fer.

SZENT GYÖRGYI, KARRER et HAWORTH, HIRST ont signalé qu'en ajoutant du chlorure ferrique à la solution aqueuse des sels de l'acide *l*-ascorbique, on obtient une substance colorée en violet-bleu. Ils considèrent que cette réaction fournit une preuve de la constitution érolique de l'acide ascorbique. MM. MOREL, ARLOING et JOSSERAND ont réussi à isoler ce corps sous forme solide.

Ils ont par ailleurs préparé diverses combinaisons de l'acide *l*-ascorbique avec des métaux alcalins et alcalino-terreux. Pour ce faire, ils ont utilisé de l'acide ascorbique de diverses origines : d'abord, un acide ascorbique qu'ils ont eux-mêmes préparé à partir des surrénales fraîches de bœuf, puis un acide ascorbique mis en vente par la maison MERCK de Darmstadt, connu sous le nom de C. BIONE ; enfin, un acide ascorbique provenant de la maison HOFFMAN-LARO-

CHE et C^{ie} de Bâle, et qui serait préparé par la méthode synthétique de REICHSTEIN et GRUSSNER.

Ce dérivé renfermant du fer dans sa constitution est désigné par les auteurs sous le nom d'ascorboferrine. C'est une poudre colorée en violet-bleu intense, très soluble dans l'eau, en donnant une solution de la même nuance qui est peu stable et perd, au bout de 20 minutes, à froid, instantanément à chaud, sa coloration et ses propriétés chimiques essentielles. Une étude plus approfondie de la constitution chimique de ce corps montre qu'il est en fait constitué par plusieurs composants, de pouvoir réducteur et degré d'oxydation différents. Ce produit global dont la teneur en fer est 16,4 %, renferme 45 % de son fer à l'état ferreux. Par ailleurs, son pouvoir fixateur sur l'iode n'est que 16 % du pouvoir de l'acide *l*-ascorbique. Il faut en conclure que concurremment à sa formation, une partie de fer $+++$ est réduit à l'état de fer $++$, cependant qu'une partie de l'acide *l*-ascorbique est au contraire oxydée. Telle est la première étape des recherches chimiques de MM. ARLOING, MOREL et JOSSEMAND.

Une deuxième étape a été marquée par les essais des auteurs lyonnais en vue de faire réagir les hydrates des oxydes ferreux, d'une part, et ferriques, d'autre part, séparément sur l'acide *l*-ascorbique et sur l'acide déhydroascorbique, tous deux en présence de bicarbonate de soude.

L'hydrate ferrique réagit sur l'acide *l*-ascorbique en se réduisant.

L'hydrate ferrique se fixe sur l'acide déhydroascor-

bique en donnant un produit soluble dans l'eau ayant une nuance rouge-orangé. Quand il est sec, ce produit donne une poudre colorée en jaune clair, renfermant 14,5 % de fer entièrement ferrique et 7,5 % de sodium. Les auteurs l'appellent ferriscorbone ; on le conserve à l'abri de la lumière.

L'hydrate ferreux se fixe sur l'acide *l*-ascorbique en donnant un produit fortement coloré en bleu-violet, soluble dans l'eau, renfermant 19 % de fer et 1,2 % de sodium. Ce produit ferreux est de conservation très difficile, même dans un gaz inerte comme l'azote ; il porte le nom de ferrosorbone.

L'hydrate ferreux ne se fixe pas sur l'acide déhydroascorbique.

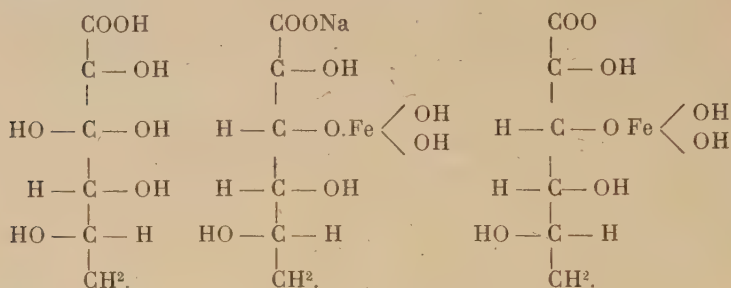
Une troisième étape a consisté à partir de l'acide 2.3.dicéto-*l*-gulonique. Cet acide est obtenu par séjour de 4 jours à la température du laboratoire d'une solution aqueuse de 1 % environ d'acide déhydroascorbique resté en présence de l'acide chlorhydrique formé au cours de l'oxydation par l'eau de chlore qui a permis de le réaliser à partir de l'acide *l*-ascorbique. Son pouvoir rotatoire spécifique devenu lévogyre est égal à $\alpha_D^{20} = -7^\circ$.

A partir de cet acide dicéto-gulonique, les auteurs lyonnais ont obtenu dans les conditions indiquées plus haut :

a) Un sel complexe ferrico-magnésien rappelant la ferriscorbone magnésienne, en raison du rôle que jouent le fer à sa valence supérieure et le magnésium dans les phénomènes fermentaires.

b) Une solution aqueuse de 1 % environ de cet acide partiellement neutralisé par addition de bicarbonate de soude jusqu'à pH 6,4 (déterminé par élimination du CO₂ provenant de la décomposition de ce réactif). Cette solution maintenue à l'abri de l'air et de la chaleur leur a paru suffisamment stable.

La formule de ces corps paraît être du type suivant :



Forme pyranosique
de l'acide déhydro-*l*-ascorbique à
anneau lactonique
ouvert, et à l'état
d'hydrate des grou-
pements cétoniques.

Ferris-
corbone
sodique.

Ferris-
corbone
magnésienne.

Ce qui fait l'intérêt particulier de ces corps, c'est leur activité sur l'évolution des lésions néoplasiques, activité longuement étudiée par les auteurs lyonnais mais que nous n'avons pas à envisager ici.

Sur les échantillons de ces corps que nous ont donnés MM. ARLOING, MOREL et JOSSERAND, nous avons étudié les phénomènes d'oxydation, toujours au moyen de l'appareil de Warburg, en milieu tamponné et non tamponné. Le tableau suivant résume nos résultats.

TABLEAU N° 13

Oxydation des ferriscorbones magnésienne et sodique, en présence de sulfate de Cu et de glutathion.

N° de l'expérience	N° de la cuve	Solution ferriscorbone Mg		Solution ferriscorbone Na		SO ₄ Cu exprimé en mmg.	Glutathion exprimé en mmg.	Tampon	pH	Durée de l'expérience exprimée en heures	O ² absorbé en mm ³	Variation % par addition de glutathion	Variation % par addition de SO ₄ Cu
		Concentration %/‰	Nombre de cc utilisés	Concentration %/‰	Nombre de cc utilisés								
1	1	8	2				2	0	5,2	1	74,25	52	
	2	8	2					0	5,2	1	113,31		
2	1			8	2		2	0	6	1	111,60	35	
	2			8	2			0	6	1	151,90		
3	1	8	2				2	0	5,2	2	91,64	73	
	2	8	2					0	3,2	2	159,38		
4	1			8	2		2	0	6	2	175,15	33	
	2			8	2			0	6	2	244,62		
5	1	8	2				2	Citrate NaOH	4,9	3	126,4	75	
	2	8	2					NaOH	4,9	3	222,2		
6	1			8	2		2	Citrate NaOH	4,9	3	252,2	57	
	2			8	2			NaOH	4,9	3	408,24		
7	1	8	2				2	Citrate NaOH	5,2	1	79	99	
	2	8	2					NaOH	5,2	1	157,56		
8	1			8	2		2	Citrate NaOH	5,2	1	119,35	69	
	2			8	2			NaOH	5,2	1	202,5		
9	1	8	2				2		4,4	1	22,12	174	
	2	8	2						4,4	1	60,6		
10	1			8	2			Phosphate disodique	4,4	1	49,60	164	
	2			8	2			Phosphate monopotassique	4,4	1	131,22		
11	1	8	1			2			5,2	2	9,96	154	343
	2	8	1						5,2	2	44,10		
	3	8	1			2	2		5,2	2	14,67	112	225
	4	8	1				2		5,2	2	112,20		
12	1			8	1	2		Phosphate disodique	6	2	31,54	112	
	2			8	1		2	Phosphate monopotassique	6	2	102,24		
	3			8	1		2		6	2	43,67		
	4			8	1		2		6	2	217,6		

De l'examen de ce tableau il ressort que :

1^o Ces corps, ferriscorbone magnésienne, aussi bien que sodique, s'oxydent spontanément à l'air à 38°, en pH acide.

2^o Le glutathion, loin de freiner cette oxydation, l'exagère au contraire.

3^o Le cuivre freine ces oxydations, même en présence de glutathion.

Le comportement de ces corps dans l'organisme doit donc être différent de celui de l'acide ascorbique.

CHAPITRE IV

Essai d'application à l'hydrologie.

Il est de la plus haute importance, lorsqu'on cherche à définir les modes d'action des eaux minérales, de connaître dans le plus fin détail la réaction des transporteurs d'hydrogène sous l'action des différentes eaux minérales. Nous avons recherché, en partant de cette idée, l'action de deux types d'eau minérale sur l'acide ascorbique.

Les eaux sulfureuses ont dû être rapidement abandonnées. Elles dégagent en effet de l'hydrogène sulfuré qui n'a pu être capté par la soude de nos cupules que d'une façon insuffisante. Il s'en est suivi une production d' H^2S suffisante pour troubler nos mesures manométriques.

Avec une eau ferrugineuse : l'eau de Charbonnières-Bains (Rhône), nous avons obtenu des résultats plus intéressants.

Il s'agit d'une eau dont l'analyse a été faite récemment par M. le Professeur Agrégé ENSELME. Cette

analyse, non encore publiée, a donné les résultats suivants :

Poids du résidu sec à 180° : 0,242.

Cations :

Potassium	K +	= 0,0084
Sodium	Na +	= 0,0073
Ammoniaque	NH ⁺ +	= 0
Calcium	Ca ++	= 0,0363
Magnésium	Mg ++	= 0,057
Fer	Fe +++	= 0,0164
Manganèse	Mn ++	= 0,0008
Alumine	Al +++	= 0,00043

Anions :

Sulfurique	SO ⁴	= 0,00343
Nitrate	NO ³	= 0,00012
Nitrite	NO ²	= néant
Chlore	Cl	= 0,01928
Brome	Br	= 0 (sur 20 l. d'eau évaporée)
Iode	I	= 0 (sur 20 l. d'eau évaporée)
Phosphate	P ² O ⁵	= 0,0174
Arsenic	AS	= 0,000023

Acides non dissociés :

Silice	SiO ²	= 0,022
Acide carbonique	CO ²	= 0,112

Cette eau a été additionnée à des solutions d'acide ascorbique et nous avons étudié l'oxydation de cet acide avant et après l'addition de l'eau. Nous nous sommes heurtés à une assez grande difficulté. La source de Charbonnières est située aux environs de Lyon ; l'eau nous a été apportée aussi rapidement que possible après son prélèvement au griffon. Cependant, entre ce prélèvement et le moment de notre étude, il s'est toujours écoulé au moins 3 à 4 heures. L'eau, au moment de son utilisation, présentait un aspect légèrement louche, pseudo-colloïdal, par début de floculation. En l'additionnant d'acide ascorbique, et en plaçant dans trois cuves de l'appareil de Warburg le liquide ainsi obtenu, nous avons malgré son homogénéité apparente, obtenu des chiffres extrêmement divers qui enlevaient à notre étude toute signification. Le tableau suivant rapporte ces chiffres :

TABLEAU N° 14

Oxydation de l'acide ascorbique en présence d'eau de Charbonnières,
d'eau distillée et de glutathion. (Acide ascorbique utilisé au moment de sa
dissolution.)
Eau de Charbonnières ayant commencé à flocculer.

N° de l'expérience	N° de la cuve	Solution d'acide ascorbique		Eau de Charbonnières	Eau distillée	Glutathion en mmg.	pH	Durée expérience exprimée en heures	O ² absorbé exprimé en mm ³
		Concentration ‰	Nombre de cc utilisés						
1	1	10	1	1			2,8	2	94,8
	2	10	1	1			2,8	2	264,62
	3	10	1	1			2,8	2	272,16
2	1	12,5	1	1			2,8	2	205,16
	2	12,5	1	1			2,8	2	113,12
	3	12,5	1	1			2,8	2	302,95
3	1	12,5	1	1			2,8	2	150,10
	2	12,5	1	1		2	2,8	2	78,88
	3	12,5	1	1		2	2,8	2	9,30

Nous avons alors cherché à améliorer nos résultats
en filtrant l'eau avant de l'additionner d'acide ascor-
bique.

Ce tableau qui rapporte les expériences ainsi obtenues montre déjà plus d'homogénéité.

TABLEAU N° 15

Oxydation de l'acide ascorbique en présence d'eau de Charbonnières, et d'eau distillée. (Acide ascorbique utilisé au moment de sa dissolution.)

Eau de Charbonnières filtrée après début de floculation.

N° de l'expérience	N° de la cuve	acide ascorbique		Eau de Charbonnières exprimée en cc	Eau distillée exprimée en cc	pH	Durée expérience exprimée en heures	O ² absorbé exprimé en mm ³
		Concentration ‰	Nombre de cc utilisés					
1	1	12,5	1	1		2,8	2	71,14
	2	12,5	1	1		2,8	2	89,10
	3	12,5	1		1	2,8	2	66,4

Nous avons obtenu un résultat qui nous a paru meilleur, (car il évite la filtration qui enlève certains éléments de l'eau tout en permettant cependant une certaine homogénéité) — en dissolvant notre acide ascorbique dans l'eau au moment de sa sortie au griffon. Cette addition d'acide ascorbique empêche pour un temps la floculation de l'eau. Un témoin avec de l'eau distillée était préparé au même moment, puis, tous les deux étaient rapportés au laboratoire

le plus vite possible, et l'étude au Warburg était alors immédiatement pratiquée. Le tableau suivant montre nos résultats :

TABLEAU N° 16

Oxydation de l'acide ascorbique en présence d'eau de Charbonnières, et d'eau distillée. Acide ascorbique a été ajouté au moment de son prélèvement au griffon. L'eau n'a subi aucune floculation.

N° de l'expérience	N° de la cuve	acide ascorbique		Eau de Charbonnières exprimée en cc.	Eau distillée exprimée en cc.	pH	Durée de l'expérience exprimée en heures	O ₂ absorbé exprimé en mm ³	Variation %
		Concentration %	Nombre de cc utilisés						
*1	1	8	1	1		2,8	3	86,9	134
	2	8	1	1		2,8	3	103,02	
	3	8	1		1	2,8	3	40,22	
2	1	4	1	1		2,8	5	125,5	35
	2	4	1	1		2,8	5	144,1	
	3	4	1		1	2,8	5	91,64	
*3	1	8	1	1		2,8	6	170,05	20
	2	8	1	1		2,8	6	194,12	
	3	8	1		1	2,8	6	133,32	
4	1	4	1	1		2,8	6	180,93	28
	2	4	1	1		2,8	6	205,70	
	3	4			1	2,8	6	135,88	
5	1	4	1	1		2,8	1	33,18	44
	2	4	1	1		2,8	1	37,80	
	3	4	1		1	2,8	1	24,45	
6	1	4	1	1		2,8	2	63,25	25
	2	4	1	1		2,8	2	68,14	
	3	4	1		1	2,8	2	52,16	

* Les expériences ont été faites avec la Laroscorbine Hoffmann-Laroche.

On voit que, soit que l'on utilise de l'eau filtrée, soit que l'on utilise de l'eau recueillie au griffon et immédiatement traitée par l'acide ascorbique, l'eau ferrugineuse de Charbonnières augmente l'oxydation de l'acide ascorbique.

CHAPITRE V

Technique suivie pour nos déterminations de la consommation d'oxygène.

Nos mensurations ont été pratiquées au moyen de l'appareil de Warburg, selon la technique décrite dans le livre : *Métabolisme cellulaire et métabolisme des tumeurs* d'OTTO WARBURG, traduit par E. AUBEL et L. GENEVOIS. Cet appareil nous a été fourni en 1935 par la maison L. KOBE de Berlin. Nous avons substitué un régulateur de température électrique au régulateur de température à gaz qui nous avait été fourni. Notre régulateur fabriqué par la maison COUPRIE est basé sur le principe de la dilatation des liquides et de leur incompressibilité. Sa forme est celle d'un tube de section ovale roulé en spirale, fermé aux deux bouts, contenant de l'éther. Un interrupteur platiné coupe et rétablit le courant avec une grande fréquence. La sensibilité de cet appareil nous a paru être de $1/30^e$ de degré. Un thermomètre placé dans toutes les expériences ne nous a jamais donné la moindre variation. Nous avons employé des cuves dont les dimensions sont les suivantes : 20 cc, 25 cc, 19 cc 66 et

20 cc 43. Les cuves contenaient des cupules dans lesquelles nous avons constamment placé de la soude, même lorsque cette précaution nous paraissait inutile.

Le volume de ces cuves a été cherché suivant les techniques indiquées par WARBURG.

Le calcul de la consommation d'oxygène au moyen des indications manométriques nécessite la connaissance du volume V du récipient à oxydation jusqu'au ménisque M du liquide manométrique. Pour déterminer V, il faut procéder de la façon suivante : on relie à son manomètre le récipient à oxydation vide dont l'intérieur est humide. On fixe le manomètre à l'appareil, le thermostat se trouvant à la température de la pièce, et en ouvrant le robinet du manomètre, on fait descendre le liquide de la quantité h au-dessous de la marque M. Ensuite, on ferme le robinet du manomètre et on fait remonter le liquide jusqu'à ce que la colonne de droite se trouve ramenée à la marque M. En même temps, la colonne de gauche montera de la hauteur h_1 , au-dessus de la marque M. On introduit maintenant par l'orifice tubulaire un volume déterminé d'eau (de a cc) dans le récipient à oxydation, et on répète la manipulation décrite précédemment. Alors la colonne manométrique de gauche s'élève plus haut, parce que la même masse de gaz est comprimée dans un espace plus étroit. En admettant que la colonne s'élève cette fois de la hauteur h_2 le volume V cherché (volume du récipient; volume du capillaire jusqu'à la marque M) est alors : $V : a \frac{h_2}{h_2 - h_1}$.

La quantité d'oxygène absorbée dans chaque expérience est donnée par la formule :

$$x = h \left(\frac{V_G \cdot \frac{273}{T} + V_F \alpha}{10.000} \right)$$

dans laquelle

x : quantité totale de gaz produit ou absorbé en mmc. (0° 760 mm.).

V_G : volume du gaz du liquide au ménisque manométrique en mmc.

V_F : volume du liquide introduit en mmc.

T : température absolue au moment de l'expérience :
dans nos expériences : 273° + 38° = 311°.

α = coefficient d'absorption de BUNSEN des gaz (pour l'oxygène = 0,024).

h : mm. de solution de BRODIE.

Le nettoyage des cuves a été opéré par ébullition dans une capsule contenant un mélange de persulfate et de perborate. Ces cuves ont été ensuite longuement lavées à l'eau ordinaire et à l'eau distillée ; les jonctions ont été lutées avec la formule suivante :

Lanoline : 100 g.

Cire blanche : 20 g.

Le liquide employé dans le manomètre est le liquide de Brodie dont la formule est la suivante :

Chlorure de sodium : 23 g.

Taurocholate de soude Merck 5 g.

Eau : 500 cc.

Solution alcoolique concentrée de thymol : quelques gouttes.

La pression normale exprimée en hauteur de la solution de Brodie est très voisine à la température ordinaire de 10.000 mm.

L'eau utilisée était de l'eau bidistillée au moyen d'un appareil en verre Pyrex.

L'acide ascorbique et les peptones ont été fournis par la maison HOFFMAN-LAROCHE. Cet acide ascorbique était de deux sortes : pour chaque type d'expérience, nous avons employé un acide pur, à point de fusion de 177° (corrigé). Nous avons encore, utilisé pour parer à la difficulté actuelle de ravitaillement, un produit appelé laroscorbine. Celui-ci est dissous, puis filtré afin d'éliminer l'amidon qui l'enrobe pour le protéger contre l'oxydation. Après filtration, il donne des résultats en tous points semblables à ceux obtenus avec le produit pur. Le produit pur a été conservé à l'abri de la lumière et à la glacière. L'un et l'autre sont très peu oxydés.

Les complexes acide ascorbique-fer ont été préparés par MM. MOREL, ARLOING et JOSSERAND. Dans tous ces produits, le cuivre, considéré comme impureté, a été recherché au moyen des techniques suivantes :

Réaction de POIROT :

Solution de gaïac dans la pyridine : 0 cc 2.

Eau oxygénée 10 volumes : 3 gouttes.

Alcool à 95 (redistillé) : 40 cc.

Liquide à examiner : 40 cc.

La présence de cuivre est décelée par l'apparition d'une coloration bleue. Limite de la sensibilité : concentration de 10^{-8} .

Réaction de KASTLE-MEYER et CARPENTIER :

Phenolphthaléine : 2 g.

Potasse pure : 20 g.

Eau distillée : 100 cc.

On fait bouillir ce réactif en présence de 10 g. de zinc en poudre jusqu'à décoloration.

Réactif de KASTLE-MEYER, THOMAS et CARPENTIER :

IV gouttes.

Liquide à essayer : 10 cc.

Eau oxygénée à 4 à 5 volumes : 1 goutte.

Une eau contenant du cuivre donne immédiatement une teinte rose passant au rouge vif en quelques secondes. Limite de la sensibilité : concentration 10^{-8} .

Les minéralisations ont été pratiquées dans des capsules de platine.

Les pH des solutions ont été pris par les méthodes colorimétriques. Les solutions-tampon ont été préparées selon les formules classiques.

1. Tampon aux phosphates :

a) Solution de 11 g. 876 ‰ de $\text{PO}^4 \text{Na}^2 \text{H} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

b) Solution de 9 g. 078 ‰ de $\text{PO}^4 \text{H}^2 \text{K}$.

Phosphate disodique	Phosphate mono- potassique	pH du mélange
0,25 cm ³	9,75	5,288
0,5	9,5	5,589
1,0	9,0	5,906
2,0	8,0	6,239
3,0	7,0	6,468
4,0	6,0	6,643
5,0	5,0	6,813
6,0	4,0	6,979
7,0	3,0	7,168
8,0	2,0	7,381
9,0	1,0	7,731
9,5	0,5	8,043

2. *Tampon au citrate :*

a) Solution de 21 g. 008 d'acide citrique hydraté dans 200 cc d'une solution normale de soude, complétée à 1 litre.

b) Solution décimale de soude.

Citrate	Soude	pH du mélange
9,45 cm ³	0,5 cm ³	5,023
9,0	1,0	5,109
8,0	2,0	5,314
7,0	3,0	5,568
6,0	4,0	5,969
5,5	4,5	6,331
5,25	4,75	6,678
4,5	5,3	12,073
4,0	6,0	12,364

La comparaison de l'absorption de l'oxygène pour une même solution d'acide ascorbique répartie dans différentes cuves a montré que les erreurs des mélanges n'avaient pas dépassé 12 %.

Nous n'avons tenu compte que des variations qui dépassaient nettement ce pourcentage et qui se sont montrées constantes.

Un grand nombre de tentatives faites pour réduire ce pourcentage d'erreurs ont été vaines. Nous espérons obtenir sa réduction par l'emploi de cuves plus petites et en silice que nous sommes en train de faire construire et qui par suite des difficultés actuelles n'ont pas encore pu nous être livrées.

CONCLUSIONS

Notre étude centrée autour de l'oxydation de l'acide ascorbique, comprend plusieurs chapitres.

I. Nous avons poursuivi plusieurs recherches sur l'oxydation de l'acide ascorbique en solution acide. Une revue générale des travaux déjà publiés nous a conduit à la notion de stades successifs d'oxydation. L'étude des travaux antérieurs, tant physiques que chimiques, conduit à penser qu'il existe, après dissolution de l'acide ascorbique dans l'eau, en présence de l'air, une évolution qui peut être décrite ainsi :

1° Dans un premier temps, l'acide ascorbique s'oxyde en acide déhydroascorbique en utilisant un atome d'oxygène pour cette oxydation. Cette oxydation porte sur les deux hydrogènes des groupes énoïques. Ce temps paraît bien être le seul qui se réalise de pH 1 à pH 4.

2° Dans un deuxième temps, l'acide ouvre sa chaîne lactonique.

3° Dans un troisième temps, qui comporte peut-être des intermédiaires, il s'oxyde à nouveau et cette oxydation aboutit à la fracture de la molécule en acide oxalique et acide tréhonique.

Ces oxydations ne se produisent pas dans l'eau parfaitement pure, mais une trace de cuivre suffit à les provoquer.

Afin de poursuivre l'étude de ces faits, qui paraissent aujourd'hui bien démontrés, nous avons utilisé la méthode manométrique de Warburg. De nos expériences, nous concluons :

1° Nous avons retrouvé l'action activante des ions cuivre sur l'oxydation de l'acide ascorbique signalée déjà par un assez grand nombre d'auteurs. Nous l'avons observée :

a) En milieu non tamponné, à pH 2,6. A ce pH, il ne se produit vraisemblablement que le premier temps de l'oxydation.

b) En milieu tamponné, par des solutions de phosphate, à pH 6,8. A ce pH se réalisent au contraire, sans doute, tous les temps de l'oxydation.

Dans tous ces cas, et à tous les pH, le glutathion arrête l'absorption d'oxygène.

2° Le fer, sous la forme Fe^{+++} , à pH 2,6, en solution non tamponnée, active lui aussi cette oxydation. Par contre, sous sa forme Fe^{++} , cet ion paraît sans action (1).

Le glutathion arrête l'oxydation par l'ion Fe^{+++} .

3° Si l'on ajoute de la peptone de *raia clavata* (raie)

(1) Une réserve est cependant à faire. Nous avons utilisé du sulfate ferrique pur Poulenc. Nous reprenons ces expériences avec un sulfate ferrique pur préparé par nous mêmes et dont nous nous efforcerons de préciser les caractères de pureté.

à une solution récente d'acide ascorbique en milieu non tamponné, à des pH acides ne dépassant pas pH 4, on note une diminution de l'oxygène absorbé.

4° Si l'on fait une solution d'acide ascorbique dans une eau distillée, dans des vases en pyrex, si l'on place cette eau dans un tonomètre en pyrex, et si on l'agite mécaniquement pendant plusieurs heures, après un certain temps, elle aboutit, à pH 2,6, à un équilibre. Si l'on ajoute alors des ions Cu^{++} , l'équilibre est rompu et une nouvelle oxydation se produit. Là, encore, le phénomène est inhibé par addition de glutathion.

5° Si l'on ajoute les glucides suivantes : glucose, galactose, lactose, mannose, dextrine, à une de ces solutions équilibrées d'acide ascorbique, en milieu non tamponné, et à divers pH acides allant de pH 2,6 à pH 6,2, on ne provoque aucune nouvelle absorption d'oxygène.

Une addition de glutathion est sans effet.

6° Si l'on ajoute les acides aminés suivants : glyco-colle, tyrosine, à une de ces solutions équilibrées d'acide ascorbique, en milieu non tamponné ou en milieu tamponné avec des citrates, à pH 2,6 ou à pH 6,5, on n'observe aucune nouvelle absorption appréciable d'oxygène.

7° Si l'on ajoute les peptones suivantes : peptone de raie, d'écrevisse, de perche, de jaune d'œuf, à une de ces solutions équilibrées d'acide ascorbique :

En milieu tamponné de pH 2,6 à pH 5,

En milieu tamponné avec des phosphates, de pH 6,4 à pH 6,8,

En milieu tamponné avec du citrate, de pH 4,8 à pH 6,2,

on a une nouvelle absorption d'oxygène.

Le glutathion empêche cette absorption.

8° Nous avons au passage noté une certaine autoxydation des peptones utilisées.

II. Nous avons encore étudié l'oxydation de deux complexes, à base d'acide ascorbique et de fer, complexes découverts et décrits par MM. ARLOING, MOREL et JOSSERAND, sous le nom de ferriscorbones magnésiennes et de ferriscorbones sodiques.

1° En solution tamponnée ou non tamponnée, à des pH compris entre pH 4,4 et pH 6, ces corps s'oxydent spontanément.

2° Le glutathion augmente de manière appréciable ces oxydations.

3° Le cuivre semble au contraire les diminuer, même en présence de glutathion.

Le comportement des ferriscorbones est donc, sur ces deux points : action du glutathion et action du cuivre sur leur oxydation, en opposition complète avec le comportement de l'acide ascorbique.

III. Nous avons essayé d'étudier le rôle joué par une eau ferrugineuse (l'eau de Charbonnières-les-Bains), sur le processus d'oxydation de l'acide ascorbique. Nous nous sommes heurtés à de grandes difficultés, d'où il ressort que :

1^o Tout début de floculation des éléments de l'eau minérale rompt l'homogénéité du milieu et empêche toute observation correcte des faits.

2^o L'addition d'acide ascorbique, directement pratiquée au niveau du griffon, dans le prélèvement, retarde cette floculation et permet d'obtenir des résultats plus réguliers.

3^o Par cette technique, on voit que l'eau minérale augmente la quantité d'oxygène absorbée par la solution d'acide ascorbique.

Ces faits pourraient susciter de longs commentaires. Il ne s'agirait que d'hypothèses trop précoces. Nous préférons nous réserver et ne conclure que par l'exposé strict des faits.

Le Président de la Thèse,
ALBERT MOREL.

Vu :
Le Doyen,
JEAN LÉPINE.

Vu et permis d'imprimer,
Lyon, le 28 juin 1944.

POUR LE RECTEUR ET PAR DÉLÉGATION :
Le Vice-Président du Conseil de l'Université,
GARRAUD.

BIBLIOGRAPHIE

- ARLOING (F.), MOREL (A.) et JOSSE RAND (A.). — Action sur les tumeurs, en injections intraveineuses, de produits chimiques solubles dans lesquels le fer est associé à la vitamine C (Acide ascorbique). *C. R. Ac. Sc.*, 1935, 201, p. 456-458.
- ARLOING (F.), MOREL (A.) et JOSSE RAND (A.). — Action sur les tumeurs, en injections intraveineuses, de nouveaux sels complexes solubles ferrico-ascorbiques. *C. R. Ac. Sc.*, 1935, 201, p. 745-747.
- ARLOING (F.), MOREL (A.) et JOSSE RAND (A.). — Nouvelles recherches sur l'action vis-à-vis des cancers des complexes organicométalliques solubles des acides ascorbique et déhydrascorbique, où le fer est remplacé par le cuivre ou le titane. *C. R. Ac. Sc.*, 1937, 204, p. 824-825.
- ARLOING (F.), MOREL (A.) et JOSSE RAND (A.). — Effet, vis-à-vis des cancers expérimentaux, d'un produit d'action du chlorure ferrique sur les sels de l'acide l-ascorbique. *C. R. Soc. biol. Lyon*, 1935, 118, p. 551-554.
- ARLOING (F.), MOREL (A.) et JOSSE RAND (A.). — Essais d'injections intraveineuses de produits de la réaction ferrico-ascorbique sur des cancéreux. *C. R. Soc. biol., Lyon*, 1935, 118, p. 1435-1437.
- ARLOING (F.), MOREL (A.) et JOSSE RAND (A.). — Action sur les cancers expérimentaux et humains d'injections intraveineuses de combinaisons du fer et de la vitamine C (acide l-ascorbique). Nouvelles recherches. *C. R. Soc. biol., Lyon*, 1935, 120, p. 201-204.

- ARLOING (F.), MOREL (A.) et JOSSERAND (A.). — Action favorisante, sur une tumeur expérimentale, d'injections intraveineuses d'acide *l*-ascorbique non associé au fer ou associé au cuivre. *C. R. Soc. biol. Lyon*, 1935, 120, p. 205-207.
- ARLOING (F.), MOREL (A.) et JOSSERAND (A.). — Action in vitro des complexes fer-vitamine C — diverses bases sur la coagulation sanguine. *C. R. Soc. biol. Lyon*, 1936, 121, p. 39-41.
- ARLOING (F.), MOREL (A.) et JOSSERAND (A.). — Nouvelles recherches sur l'action anti-coagulante in vitro de sels complexes dérivés de la vitamine C et du cuivre, du titane ou du zinc, associés à d'autres métaux. *C. R. Soc. biol. Lyon*, 1936, 121, p. 1479-1480.
- ARLOING (F.), MOREL (A.), JOSSERAND (A.), COLLET (P.) et BADINAND (A.). — Action de la ferriscorbone sodique en injection intraveineuses sur l'acétonurie dans le diabète spontané du chien. *C. R. Soc. biol. Lyon*, 1936, 122, p. 575-577.
- ARLOING (F.), MOREL (A.), JOSSERAND (A.), THÉVENOT (Lucien) et PERRET (M^{lle} J.-M.). — Action des complexes organo-métalliques de la Vitamine C sur le pouvoir fermentatif de la levûre de bière. *C. R. Soc. biol. Lyon*, 1936, 122, p. 577-579.
- ARLOING (F.), MOREL (A.), JOSSERAND (A.) et THÉVENOT (Lucien). — Action favorisante du pouvoir pathogène expérimental du vibrion septique exercée par un complexe sodique entre le fer et l'acide *l*-ascorbique. *C. R. Soc. biol. Lyon*, 1937, 125, p. 281-283.
- ARLOING (F.), MOREL (A.), JOSSERAND (A.), THÉVENOT (L.) et CAILLE (R.). — Action de la Vitamine C et de ses complexes organo-métalliques sur le développement et le pouvoir fermentatif du *Bacterium coli*. *C. R. Soc. biol. Lyon*, 1937, 126 p. 5-7.

- ARLOING (F.), MOREL (A.) et JOSSEKAND (A.). — Indications du traitement des cancers gastriques par les injections intraveineuses de complexes ferroso-ferriques ou ferriques préparés à partir de la Vitamine C (ferriscorbones). 2^{me} mémoire. Mise au point de la question. *Journ. Méd. Lyon*, 1938, p. 7-11.
- ARLOING (F.), MOREL (A.), JOSSEKAND (A.) et POLLOSSON (E.). — A propos de deux observations de cancer gastrique opéré grâce à un traitement chimiothérapique par ferriscorbones. *Journ. Méd. Lyon*, 1938, p. 13-14.
- BALL (E.). — Studies on Oxidation-reduction. XXIII. Ascorbic Acid. *Journ. of biol. Chem.*, 1937, 118, p. 219-239.
- BARRON (G.), DE MEIO (R. H.) and KLEMPERER (F.). — Studies on biological Oxidation. V. Copper and Hemochromogens as Catalyst for the Oxydation of Ascorbic Acid and the Mecanism of the Oxydation. *Journ. of Biol. Chem.*, 1935-1936, 112, p. 625-640.
- BÉRARD (L.), MOREL (A.), ARLOING (F.), JOSSEKAND (A.) et PERROT (L.). — Cancers et acide déhydrascorbique à anneau lactonique ouvert : Effets des sels complexes ferrico-sodiques préparés à partir de cet acide sur certains éléments cliniques du processus néoplasique. *Bull. Ac. Méd.*, 1939, 121, p. 451-456.
- BEZSSONOFF (M. M.) et WOLOSZYN (M^{me} M.). — Sur l'existence d'une forme oxydée, intermédiaire entre la vitamine C et l'acide déhydrascorbique. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1938, 20, p. 93-122.
- BEZSSONOFF (N.) et WOLOSZYN (M^{me} M.). — Sur les phénomènes qui accompagnent l'oxydation de la vitamine C. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, 122, p. 941-944.
- BEZSSONOFF (N.) et WOLOSZYN (M^{me} M.). — Les particularités de l'oxydation réversible de la vitamine C démontrées par l'épreuve sur le cobaye. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, 122, p. 944-946.

BEZSSONOFF (N.). — A propos du potentiel de l'acide ascorbique. *Journ. Chim. Phys.*, 1935, 32, p. 210-214.

BORSOOK (H.), DAVENPORT (H. W.), JEFFREYS (C. E. P.) and WARNER (R. C.). — The Oxidation of Ascorbic Acid ; its Reduction in vitro and in vivo. *Journ. of biol. Chem.*, 1937, 117, p. 237-279.

BORSOOK (H.) and KEIGHLEY (G.). — Oxidation-reduction Potential of Ascorbic Acid (Vitamin C). *Proc. Nat. Ac. Sc.*, 1933, 19, p. 875-878.

BORSOOK (H.) and SCHOTT (H. F.). — The Role of the Enzyme in the succinate-enzyme-fumarate Equilibrium. *Journ. of biol. Chem.*, 1931, 92, p. 535-557.

BOYLAND (E.). — The selective Absorption of Ascorbic Acid by Guinea-pig tumor Tissue. *Biochem. Journ.*, 1936, 30, p. 1221-1224.

EULER (H. von), MYRBACK (K.) et LARSSON (H.). — Sauerstoffaufnahme durch Vitamin C-haltige Organe und durch Gluco-Redukton. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1933, 217, p. 1-22.

FARLANE (W. D. Mc). — Some Observations on the Reduction of Iron by Tissue Extracts and by Ascorbic Acid, with a Note on the Stabilization of Ascorbic Acid Solutions. *Biochem. Journ.*, 1936, 30, p. 1472-1478.

FOX (F. W.) and LÉVY (L. F.). — Reversible Oxidation of Ascorbic Acid by Means of norite Charcoal. *Biochem. Journ.*, 1936, 30, p. 208-210.

FRUTON (J. S.). — Oxidation-reduction Potentials of Ascorbic Acid. *Journ. of biol. Chem.*, 1934, 105, p. 79-85.

GEORGESCU (I. D.). — Sur le potentiel d'oxydo-réduction des acides hexuroniques. *Journ. de Chim. Phys.*, 1932, 29, p. 217-237.

- GIROUD (A.) et LEBLOND (C.-P.). Recherches histochimiques sur la vitamine C dans l'organisme. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1934, 16, p. 1353.
- GREEN (D. E.). — The Potentials of Ascorbic Acid. *Biochem. Journ.*, 1933, 27, p. 1044-1048.
- HAWORTH (W. N.) et HIRST (E. L.). — The Chemistry of Ascorbic Acid (Vitamin C) and its Analogues. *Ergebnisse der Vitamin-und Hormonforschung*, 1939, 2, p. 160-191.
- KARRER (P.), SALOMON (H.), MORF (R.) und SCHOPP (K.). — Zur Kenntnis des antiscorbutischen Vitamins (Vitamin C, Ascorbinsäure). *Biochem. Ztschrift.*, 1933, 258, p. 4-15.
- KARRER (P.), SALOMON (H.) and SCHOPP (K.). — Constitution of Dehydro-Ascorbic Acid. *Nature*, 1933, 131, p. 800.
- KARRER (P.), SCHWARZENBACH (G.) und SCHOPP (K.). — Ueber Vitamin C. *Helv. Chem. Act.*, 1933, 16, p. 302-306.
- KELLIE (A. E.) and ZILVA (S. S.). — The catalytic Oxidation of Ascorbic Acid. *Biochem. Journ.*, 1935, 29, p. 1028-1035.
- KELLIE (A. E.) and ZILVA (S. S.). — The alleged Presence of dehydroascorbic Acid in Blood. *Biochem. Journ.*, 1936, 30, p. 360-369.
- KREBS (H. A.) et EGGLESTON (L. V.). — The effect of Insulin on Oxidations in isolated muscle Tissue. *Biochem. Journ.*, 1938, 32, p. 913-925.
- LAKI (K.). — Das Ox-Redoxpotential der Ascorbinsäure. *Ztschrift. für physiol. Chem.*, 1933, 217, p. 54-55.
- LÉPINE (J.), MOREL (A.), ARLOING (F.), JOSSE RAND (A.) et PERROT (L.). — Sclérose en plaques et acide déhydroascorbique à anneau lactonique ouvert. *Bull. A. Méd.*, 1939, 121, p. 369-372.

- HOPKINS (F. G.) and MORGAN (E. J.). — Some Relations between Ascorbic Acid and Glutathione. *Biochem. Journ.*, 1936, 30, p. 1446-1462.
- LYMAN (C. M.), SCHULTZE (M. O.) and KING (C. G.). — The effect of metaphosphoric Acid and some other organic Acids on the catalytic oxydation of Ascorbic Acid. *Journ. of biol. Chem.*, 1937, 118, p. 757-764.
- MAWSON (C. A.). — The Influence of Animal Tissues on the Oxidation of Ascorbic Acid. *Biochem. Journ.*, 1935, 29, p. 569-579.
- MAYER-REICH (M^{me} N.). — Propriétés oxydoréductrices des glucides évolués à l'abri de l'oxygène. *Journ. Chim. phys.*, 1934, 31, p. 9-42.
- MICHEEL (F.) and KRAFT (K.). — Constitution of Vitamin C. *Nature*, 1933, 131, p. 274-275.
- MICHEEL (F.) und KRAFT (K.). — Die Konstitution des Vitamins C. *Ztschrft. für physiol. Chem.*, 1933, 215, p. 224. 1933, 216, p. 233-238. 1933, 218, p. 280-282.
- MOREL (A.), GAUTIER (Cl.), ROCHAS (M^{lle}) et MARTHOUD (R.). Présentation pratique de réactions colorées de certains glucides. *VI^{me} Congrès de Chimie Biol.*, 1937, p. 381-384.
- MOURIQUAND (G.), ARLOING (F.), MOREL (A.), JOSSE RAND (A.) et ARMAND (M^{lle} S.). — Limites de la manifestation du pouvoir antiscorbutique dans les sels complexes dérivés de la Vitamine C (ferroscorbone et ferriscorbone sodiques). *C. R. Soc. biol. Lyon*, 1937, 124, p. 661-664.
- PARROD (J.). — Oxydation de l'acide l-ascorbique en présence d'ammoniaque ou d'amines primaires. *Bull. Soc. chim.*, 1938, 5, p. 838-941.
- PARROD (J.). — Formation d'oxamide par oxydation de l'acide déhydroascorbique en solution ammoniacale, à l'aide de l'eau oxygénée. *Bull. Soc. chim.*, 1938, 6, p. 392-396.

- REICHSTEIN (T.), GRUSSNER (A.) und OPPENAUER (R.). — Die Synthese der d. Ascorbinsäure. *Helv. chim. act.*, 1933, 16, p. 561-565.
- REICHSTEIN (T.), GRUSSNER (A.) und OPPENAUER (R.). — Synthese der d. und l-Ascorbinsäure. (C-Vitamin). *Helv. chim. act.*, 1933, 16, p. 1019.
- REICHSTEIN (T.) und OPPENAUER (R.). — Reduktinsäure ein stark reduzierendes Abbauprodukt aus Kohlehydraten. *Helv. chim. Act.*, 1933, 16, p. 988-998.
- REICHSTEIN (T.) und GRUSSNER (A.). — Eine ergiebige Synthese der l-Ascorbinsäure (C Vitamin). *Helv. Chim. Act.*, 1934, 17, p. 311-328.
- SRINIVASAN (M.). — Ascorbic Acid Oxidase from Drumstick, *Moringa pterygosperma*. *Biochem. Journ.*, 1936, 30, p. 2077-2084.
- SZENT-GYÖRGYI (A.). — Observations on the function of peroxydase Systems and the Chemistry of adrenal Cortex. Description of a new carbohydrate Derivative. *Biochem. Journ.*, 1932, 22, p. 1387-1409.
- SZENT GYÖRGYI (A.). — On the Function of hexuronic Acid in the Respiration of the cabbage. *Life. Journ. of biol. Chem.*, 1931, 90, p. 385-393.
- TAUBER (H.), KLEINER (I. S.) and MISHKIND (D.). — Ascorbic Acid (Vitamin C) Oxidase. *Journ. of biol. Chem.*, 1935, 110, p. 211-218.
- THUNBERG (T.). — Zur Kenntnis der Dehydrogenasen der Geschlechtszellen. *Skand. Archiv für Physiol.*, 1925, 46, p. 137-142.
- THUNBERG (T.). — Das Reduktions-oxydationspotential eines gemisches von Succinat-Fumarat. *Skand. Arch. für Physiol.*, 1925, 46, p. 339-340.
- WURMSER (R.) et de LOUREIRO (J. A.). — Le potentiel d'oxydo-réduction de l'acide ascorbique. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, 113, p. 543-544.

- WURMSER (R.) et de LOUREIRO (J. A.). — Systèmes oxydo-réducteurs réversibles dans les milieux cellulaires. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, 116, p. 101-103.
- WURMSER (R.) et de LOUREIRO (J. A.). — La réversibilité de l'oxydation de certains dérivés des glucides, en particulier de l'acide ascorbique. *Journ. Chim. phys.*, 1934, 31, p. 419-432.
- WURMSER (R.) et de LOUREIRO (J. A.). — Sur la durée de vie de la forme oxydée réversible de l'acide ascorbique. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, 116, p. 583-585.
- WURMSER (R.), MAYER (N.) et CRÉPY (O.). — Le potentiel d'oxydoréduction de la réductone. *Journ. Chim. Phys.*, 1936, 33, p. 101-110.
-

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE PREMIER. — L'acide ascorbique, agent d'oxydo-réduction	9
A. Généralités	9
B. Étude de l'acide ascorbique par les techniques électrométriques	18
C. Étude de l'oxydation de l'acide ascorbique par les techniques colorimétriques.....	43
D. Étude de l'oxydation de l'acide ascorbique par les techniques chimiques.....	66
E. L'expression de ces oxydations d'après les formules de constitution de l'acide ascorbique et de ses produits d'oxydation.....	72
CHAPITRE II. — L'oxydation de l'acide ascorbique par l'oxygène moléculaire, en présence de divers ions et de certaines molécules.....	81
I. L'oxydation spontanée de l'acide ascorbique en solution aqueuse.....	82
II. Le rôle du cuivre dans l'oxydation de l'acide ascorbique	85
III. Le rôle du fer et d'un certain nombre d'autres métaux dans l'oxydation de l'acide ascorbique	95

IV. Le rôle des glucides dans l'oxydation de l'acide ascorbique	98
V. Le rôle des protéines dans l'oxydation de l'acide ascorbique	105
VI. Rôle des lipides dans l'oxydation de l'acide ascorbique	115
CHAPITRE III. — Oxydation de complexes acides dicétogulonique-fer	117
CHAPITRE IV. — Essai d'application à l'hydrologie.	123
CHAPITRE V. — Technique suivie pour nos déterminations à la consommation d'oxygène.....	131
CONCLUSIONS	139
BIBLIOGRAPHIE.....	145

Imprimerie EMMANUEL VITTE
177, avenue Félix-Faure - Lyon

27.947
